

Université de Montréal

**La forme Diaphanous est essentielle pour
l'organisation et la maturation de l'anneau contractile
pendant la cytokinèse**

par

Yvonne Ruella

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de médecine

Mémoire présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès science
en pathologie et biologie cellulaire

Décembre, 2013

© Yvonne Ruella, 2013

Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

**La formine Diaphanous est essentielle pour
l'organisation et la maturation de l'anneau contractile
pendant la cytokinèse**

Présenté par :

Yvonne Ruella

a été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

Sébastien Carréno, Président rapporteur

Gilles Hickson, Directeur de recherche

Roger Lippé, Membre du jury

Résumé

Une cellule se divise en deux par le processus de cytokinèse. Elle requiert la coordination de plusieurs composants pour éviter la formation des cellules potentiellement cancéreuses. Premièrement, un anneau contractile (AC) dépendant de l'actine et de Rho-GTP diminue le diamètre de la cellule jusqu'à la formation d'une structure plus stable indépendante de l'actine, l'anneau du midbody (AM) qui guide l'éventuelle séparation des cellules sœurs. Diaphanous (Dia) est une formine dépendante de Rho responsable de l'agencement des filaments d'actine non ramifiés qui se localise à l'AC et est essentielle à la cytokinèse. Nous avons étudié le rôle de Dia pendant la cytokinèse par microscopie de haute résolution en temps réel pour suivre le comportement dynamique des protéines fluorescentes (PF) dans des cellules de *Drosophila* S2. Une construction fonctionnelle de Dia-PF est recrutée à l'AC et l'AM indépendamment de l'actine mais est absente dans l'AM mature. Dia quitte l'AM au même temps où l'AM dévient indépendant d'actine. La déplétion de Dia par ARN interférant ralentit la constriction de l'AC, augmente les oscillations et, dans 70% des cas, les cellules échouent la cytokinèse pendant la constriction, suggérant que Dia a un rôle dans l'organisation de l'AC. LifeAct-PF, une sonde pour F-actine, dévoile une diminution des filaments d'actine spécifique à l'AC des cellules dépourvues de Dia pendant que Anilline-PF et Myosine-PF sont recrutées en *puncta*. Ces résultats soutiennent un modèle où Dia nuclé des filaments d'actine qui permettent l'organisation dynamique de l'AC et la perte de Dia régule la transition à l'AM stable indépendant d'actine.

Mots-clés : Diaphanous, cytokinèse, actine, anneau contractile, anneau du midbody.

Abstract

Cytokinesis is the intricate process by which eukaryotic cells divide in two. It involves the coordination of many components in order to avoid the formation of potentially cancerous cells. Initially, a Rho GTPase- and actomyosin-dependent contractile ring (CR) drives constriction at the cell equator until a stable actin-independent midbody ring (MR) forms and ultimately guides the separation of the two sister cells. Diaphanous (Dia), is a Rho-dependent formin that nucleates unbranched actin filaments, localises to the cleavage furrow and is required for cytokinesis. We have examined the role of Dia during cytokinesis by time lapse video microscopy of *Drosophila* S2 cells expressing markers tagged with fluorescent proteins (FPs). A functional Dia-FP was recruited to the CR independently of actin and stayed in the nascent MR, but was absent from the mature MR. The timing of its disappearance coincided with the transition of the MR to an actin-independent structure. RNAi-mediated depletion of Dia slowed furrow ingression, enhanced furrow oscillations and, in 70% of the failures, prevented furrow completion, consistent with a role for Dia in CR organization. The F-actin probe, LifeAct-FP, revealed a decrease in F-actin in Dia-depleted cells specifically at the CR while Anillin-FP and Myosin-FP were aberrantly recruited in punctate structures. Our findings are consistent with a model in which Dia nucleates actin filaments at the CR to maintain the dynamic organization of the actin-dependent CR and that the regulated loss of Dia from the nascent MR guides the formation of the stable, actin-independent MR.

Keywords : Diaphanous, cytokinesis, actin, contractile ring, midbody ring

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations	x
Remerciements.....	xii
1 Introduction.....	1
1.1 La division cellulaire.....	1
1.1.1 Diviser pour multiplier : le cycle cellulaire	1
1.1.2 Se préparer pour la division	2
1.1.3 La mitose et la cytokinèse.....	3
1.1.4 Le contrôle de la division cellulaire.....	15
1.1.5 Les organismes modèles pour l'étude de la division cellulaire	16
1.2 L'actine	18
1.2.1 Les filaments d'actine	19
1.2.2 La nucléation vs polymérisation d'actine	20
1.2.3 Les protéines qui interagissent avec l'actine	22
1.2.4 Drogues du cytosquelette spécifiques à l'actine	23
1.2.5 L'actine dans la division cellulaire.....	23
1.3 Diaphanous	27
1.3.1 Dia dans la cytokinèse	29
1.3.2 Dia dans les maladies.....	30
1.3.3 Protéines qui interagissent avec Dia.....	31
2 Project de Recherche	34
2.1 Problématiques et hypothèses	34
2.2 Procédures expérimentales et objectifs.	34

3	Matériel et Méthodes	36
3.1	Lignées cellulaires et constructions	36
3.2	Génération de l'ARNdb	38
3.3	Microscopie	39
3.4	Immunofluorescence	39
3.5	Immunobuvardage de type western	40
4	Résultats	42
4.1	Dia est essentielle pour la cytokinèse	42
4.2	La déplétion de Dia affecte l'organisation et le comportement de l'AC	49
4.3	Localisation de Dia pendant la cytokinèse	55
4.3.1	Dia localise à l'AC et à l'AM prématuré	55
4.3.2	Les troncations de Dia ne localisent pas à l'AC ni à l'AM	59
4.4	Localisation de l'actine pendant la cytokinèse	61
4.4.1	L'intensité d'actine augmente dans l'AC	61
4.4.2	L'actine n'est plus enrichie à l'AC en absence de Dia	62
4.4.3	Le traitement avec LatA écarte les <i>puncta</i> issues d'une déplétion de Dia	65
5	Discussion	72
5.1	La déplétion de Dia par ARNdb est efficace	72
5.2	La déplétion de Dia affecte la constriction équatoriale	72
5.3	Dia est responsable de l'organisation de l'AC	73
5.4	Dia localise à l'AC et à l'AM prématuré	74
5.5	L'actine n'est pas nécessaire pour la sortie de Dia de l'AM et pour son recrutement à l'AC	74
5.6	Le RBD et le domaine FH1FH2 ne sont pas responsables du recrutement de Dia	75
5.7	Dia est responsable de l'enrichissement d'actine dans l'AC	75
5.8	Deux populations d'actine sont responsables de la formation et encadrement de l'AC	77
5.9	L'Anilline est recrutée par son domaine C-terminal aux <i>puncta</i> issues d'une perte de l'actine équatoriale	77
5.10	Perspectives et futures expériences	78

6 Conclusion	79
7 Bibliographie	80
Annexe A	87
Annexe B	88

Liste des tableaux

Table I: Familles des protéines qui lient l'actine.	22
Table II: Séquences des amorces utilisées pour faire les tronctions de Dia RBD et FH1FH2	37
Table III: Séquence des amorces d'hybridation pour la construction de LifeAct.....	37
Table IV: Séquences des amorces utilisées pour la fabrication des ARNdb contre Dia38	
Table V: Séquences des amorces utilisées pour faire le mutant Dia K837,842,847A ..	88

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du cycle cellulaire.....	2
Figure 2: Représentation schématique de la mitose et la cytokinèse.....	3
Figure 3: Représentation schématique des microtubules formés par les centrosomes	4
Figure 4: Représentation schématique des trois modèles du recrutement des composants de l'AC	8
Figure 5: Réseau des possibles interactions entre les protéines dépendantes de Rho impliquées dans la formation de l'AC.....	10
Figure 6: Représentation schématique des protéines dans l'AC	13
Figure 7: Modèles qui expliquent la maturation de l'AM.....	14
Figure 8: Le model classique du contrôle du cycle cellulaire.....	16
Figure 9 : Représentation schématique du cycle de l'actine.....	18
Figure 10: Représentation schématique du filament d'actine avec détail sur les conformations des monomères d'Actine.	19
Figure 11: Comparaison des différentes modes de nucléation d'actine	21
Figure 12: L'actine est indispensable pour organiser un AC capable de contracter.....	25
Figure 13: L'AM passe d'une étape sensible à l'actine à une étape non sensible à l'actine	26
Figure 14: Exemples des structures des formines dans différentes espèces	27
Figure 15: Représentation schématique du mode d'action des formines	28
Figure 16: Localisation de Dia pendant la cytokinèse.....	30
Figure 17: Résumé des protéines qui interagissent avec Dia.....	33
Figure 18: ARNdb générés contre les différentes régions de Dia.	42
Figure 19: Réduction du niveau d'expression de Dia par traitement avec d'ARNdb ...	44
Figure 20: Représentation schématique de la procédure expérimentale.....	45
Figure 21: Détermination du temps nécessaire pour que les cellules échouent la cytokinèse en présence d'ARNdb contre Dia..	46
Figure 22: Les cellules dépourvues de Dia échouent la cytokinèse pendant ou après la contraction	47

Figure 23: Temps de l'anaphase au succès ou échec de la cytokinèse suite au traitement avec ARNdb contrôle ou contre Dia.....	48
Figure 24: La diminution de Dia cause un recrutement désorganisé d'Anilline et Myosine.	50
Figure 25 : Les cellules dépourvues de Dia démontrent une contraction équatoriale plus lente que le contrôle.....	51
Figure 26: L'AC des cellules dépourvues de Dia oscille.....	52
Figure 27: Les <i>puncta</i> trouvés dans des cellules dépourvues de Dia sont parfaitement corticaux.....	53
Figure 28: Modèle illustrant les phénotypes trouvés dans des cellules dépourvues de Dia.....	54
Figure 29 : Dia mCh est capable de rétablir la cytokinèse suite à une diminution de Dia endogène.	55
Figure 30: Dia se localise à l'AC et à l'AM prématuré.	56
Figure 31: Dia colocalise avec l'Anilline et la Myosine à l'AC et à l'AM prématuré..	57
Figure 32: Dia se localise de façon transitoire aux conglomerats d'Anilline suite au traitement avec LatA.....	58
Figure 33: Dia est recrutée en absence d'actine..	59
Figure 34: Représentation schématique des troncations de Dia.	59
Figure 35: Dia RBD et Dia FH1FH2 ne localisent pas à l'AC ni à l'AM.....	60
Figure 36: L'actine est enrichie à l'AC et à l'état précoce de l'AM	61
Figure 37: La somme de l'intensité du signal de l'actine augmente suite à la formation de l'AM et ensuite diminue soudainement..	62
Figure 38: L'actine n'est pas enrichie à l'AC ni à l'AM en absence de Dia..	63
Figure 39: L'actine n'est pas enrichie à l'AC ni à l'AM après la déplétion de Dia par ARNbd.	63
Figure 40: Le ratio de la moyenne de l'intensité d'actine à l'équateur sur les pôles dans les cellules diminue trois fois en absence de Dia.....	64
Figure 41: Représentation schématique du modèle de transition de l'AC à l'AM et sa maturation.....	65

Figure 42: Les cellules traitées avec de la LatA et les cellules traitées avec de l'ARNdb contre Dia forment des structures similaires.....	66
Figure 43: Les cellules traités avec LatA et ARNdb contre Dia forment des structures plus écartées que Dia ARNdb.....	67
Figure 44: Deux populations d'actine sont nécessaires pour la formation appropriée de l'AC.	68
Figure 45: Seulement le C terminale d'Anilline est recruté à l'équateur après déplétion de Dia.	69
Figure 46: La déplétion de la kinase Citron n'affecte pas les <i>puncta</i> formés lors de la diminution de l'expression de Dia.	71

Liste des abréviations

AC : Anneau Contractile
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AM : Anneau du Midbody
APC : Anaphase Promoting Complex
ARNdb : Acide Ribonucléique double brin
ARNi : Acide Ribonucléique interférant
ARP : Actin Related Protein
ATP : Adenosine Triphosphate
CC : Coiled- coil
Cdk : Cyclin dependent kinase
DAD : Diaphanous Autoregulatory Domain
DD : Dimerization Domain
Dia : Diaphanous
DID : Diaphanous Inhibitory Domain
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FH : Formin Homology
GAP : GTPase Activating Protein
GEF : GTPase Exchange Factor
GTP : Guanosine Triphosphate
LatA : Latrunculine A
MKLP : Mitotic Kinesin Like Protein
MRLC : Myosine Regulatory Light Chain
ORC : Origin Replication Complex
PH : Pleckstrin Homology
RBD : Rho Binding Domain
Tub : Tubuline
WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein
WH : WASP Homology

Para Juli

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de recherche, le Dr. Gilles Hickson pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci pour votre soutien, pour toujours avoir confiance en moi, pour votre enthousiasme contagieux pour la science et pour les tous les enseignements qui m'ont permis de grandir pendant mon séjour.

Je remercie également Silvana Jananji, une personne qui a été toujours disponible pour m'aider même avant de commencer ma maîtrise. Merci de répondre toujours avec patience à tous mes « Silvana, j'ai une question... »

J'aimerais remercier énormément Nour El-amine qui a été plus qu'un collègue, un ami. Merci pour prendre le temps de m'aider avec chaque PCR qui ne marchait pas, pour écouter chaque fois que j'avais un problème, pour m'aider avec ce mémoire et pour tous les biscuits qu'on a partagés.

Également je remercie grandement Amel Kechad qui m'a aidé du début à la fin. Merci pour être là et pour m'aider continuellement.

Je remercie Zlatina Drageiva, récemment arrivée au laboratoire qui m'a beaucoup aidé pendant la réalisation de ce mémoire.

À tous les étudiants d'été qui ont passé par le laboratoire et qui ont fait de chaque été un été spécial. Particulièrement je remercie Érica Seccareccia et Louis-Philippe Picard qui ont rajouté plus d'énergie au laboratoire l'été dernier.

Aux membres du laboratoire du Dr. Daniel Sinett, je tiens à remercier particulièrement à Rocio Sanchez, Benjamin Neveu et Karine Lagacé pour tout leur soutien.

Un grand merci à la fondation des étoiles du CHU Ste-Justine pour le soutien financier.

J'aimerais remercier aussi la famille Zapata, qui ont été présentes pendant la plus part de mon séjour à Ste-Justine. Merci pour me montrer que même dans l'adversité on peut trouver des raisons pour sourire.

Finalement je tiens à remercier ma famille sans qui je ne serais pas où je suis aujourd'hui. Merci à mes parents et à mon frère pour leur soutien inconditionnel et pour toujours être des exemples de persévérance et travail fort.

1 Introduction

1.1 La division cellulaire

Toute cellule vivante provient d'une cellule mère qui s'est préalablement divisée. La division cellulaire est un processus qui a été essentiel pour l'évolution ainsi que pour la survie des organismes. Des problèmes dans les divisions cellulaires à n'importe quelle étape du développement d'un organisme pluricellulaire peuvent causer des maladies comme le cancer, qui est caractérisé par la division incontrôlée des cellules.

1.1.1 Diviser pour multiplier : le cycle cellulaire

L'objectif principal de la division cellulaire est de conserver le contenu génétique d'un organisme. Chez les eucaryotes, nous trouvons deux types de divisions cellulaires : la mitose, pour les cellules asexuelles, et la méiose pour diviser les gamètes sexuels. Dans les deux cas, les cellules répartissent de façon égale leur contenu génétique pour les deux cellules filles. La principale différence entre ces deux processus est que dans la méiose les cellules filles auront la moitié du contenu génétique maternel tandis que dans la mitose, les cellules ont exactement la même quantité des chromosomes que la cellule mère.

Nous allons étudier la division cellulaire par mitose chez les eucaryotes. Le processus de la division cellulaire comporte plusieurs étapes : la phase G1, la phase S, la phase G2 et la phase M qui se superpose avec la cytokinèse. Ce processus est aussi connu comme le cycle cellulaire puisqu'une fois que la cellule termine de se diviser, les cellules filles peuvent entrer encore en phase G1 et recommencer le processus (Figure 1).

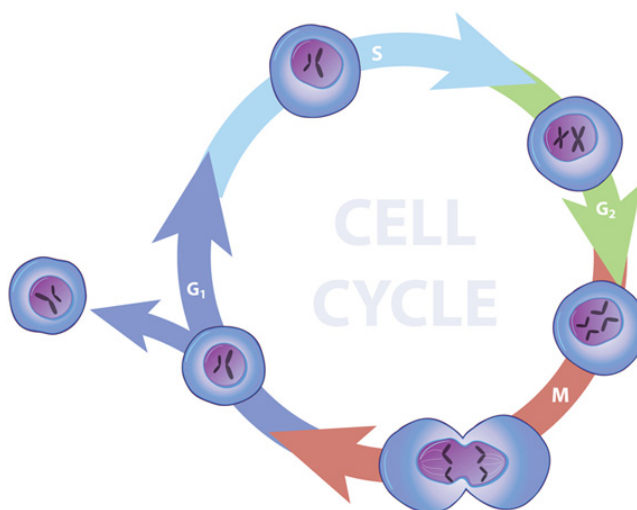


Figure 1 : Représentation schématisique du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire des eucaryotes est composé de quatre phases : G₁, S, G₂ et M. Les trois premières préparent la cellule pour la division des chromosomes dans la phase M et pour la division du cytoplasme pendant la cytokinèse (O'Connor 2010).

1.1.2 Se préparer pour la division

La cellule mère doit préparer son contenu génétique ainsi que protéique pour assurer la survie des cellules filles. Le cycle cellulaire commence avec une étape de croissance G₁ (de « Growth 1 ») où les cellules issues de la division précédente acquièrent leur taille finale.

Par la suite, à la phase S (de Synthèse), chaque chromosome se duplique afin d'assurer la transmission du même contenu génétique à chaque cellule sœur. Pour ce faire, des complexes protéiques sont ciblés vers des régions de l'ADN appelées origines de réplication. Ce processus est contrôlé par le complexe de l'origine de réplication (ORC, « Origin Replication Complex »). L'ORC est un complexe de six protéines essentiel pour commencer la réplication de l'ADN (Carpenter, Mueller et al. 1996). Une fois situé à l'origine de réplication, l'ORC recrute des protéines qui attachent les hélicases d'ADN (Rialland, Sola et al. 2002) (Bueno and Russell 1992).

Ce complexe de préréplication est responsable de l'ouverture des l'hélices d'ADN pour former les fourches de réplication (Huberman and Tsai 1973) qui permettront la synthèse du nouvel ADN par les ADN-polymérase (Loeb 1969). En même temps, les organelles responsables de la nucléation des microtubules se dupliquent (Mazia, Harris et al. 1960). Ce sont les centrosomes, des organelles formées de deux centrioles, neuf triplets de microtubules, placés à un angle de 90° (Dylewski and Keenan 1984). Une fois l'ADN dupliqué, la cellule passe par une dernière phase de croissance G2 pour garantir une quantité suffisante d'organelles aux cellules filles.

1.1.3 La mitose et la cytokinèse

La dernière phase du cycle cellulaire est la phase M (de Mitose) qui comprend le processus de division des chromosomes et la formation des noyaux dans les cellules filles. La phase M comporte plusieurs étapes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Pendant l'anaphase, la formation d'un anneau contractile (AC) permet la constriction à l'équateur de la cellule pour séparer physiquement le cytoplasme durant la cytokinèse (Figure 2).

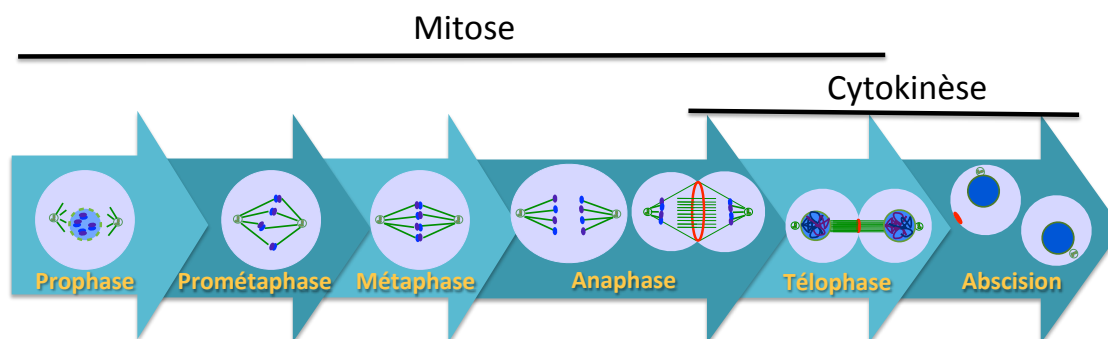


Figure 2: Représentation schématique de la mitose et la cytokinèse. Durant la prophase, l'ADN se condense et un centrosome se déplace au pôle opposé ; durant la prométaphase, les microtubules provenant des centrosomes s'attachent à l'ADN pour le placer à l'équateur pendant la métaphase et commencer sa migration vers les pôles en anaphase où l'AC se forme pour permettre l'abscission à la fin de la cytokinèse.

- La prophase

Pendant la prophase, l'ADN dans le noyau recrute le complexe des condensines et cohesines qui commencent le processus de condensation du matériel génétique (Hirano, Kobayashi et al. 1997). La condensation facilitera le déplacement de l'ADN dans l'anaphase. Parallèlement, un des centrosomes dupliqués à la phase S, se déplace vers le pôle opposé pour commencer la polymérisation des microtubules dans la prométaphase.

- La prométaphase

Les microtubules jouent un rôle primordial lors de la prométaphase. Les microtubules sont des structures tubulaires formées par des dimères des sous unités α -tubuline et β -tubuline. Ce sont des filaments dynamiques polarisés avec une extrémité positive où des dimères α/β liés avec un GTP sont rajoutés et une extrémité négative qui est toujours attachée aux centrosomes. Les microtubules polymérisés par les centrosomes peuvent se diviser en trois populations : les microtubules interdigités, les microtubules astraux et les microtubules kinétochoriens (Figure 3).

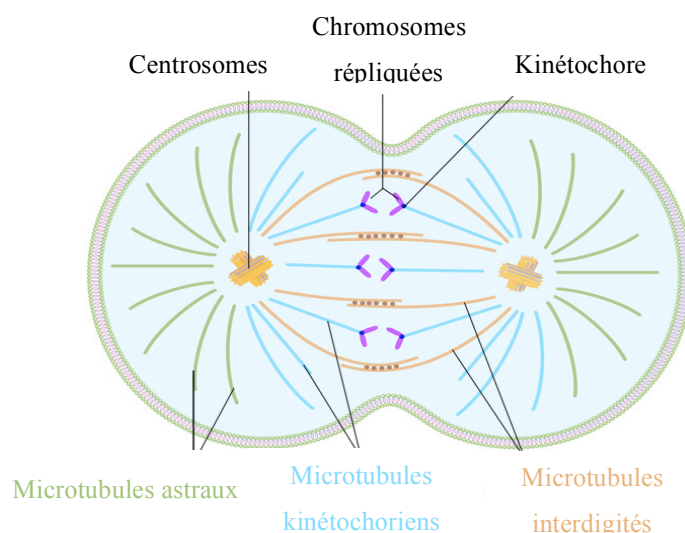


Figure 3: Représentation schématique des microtubules formés par les centrosomes. Trois sortes de microtubules sont polymérisés pendant la prométaphase : les microtubules astraux (vert), les microtubules kinétochoriens (bleu) et les microtubules interdigités (orange). Adapté de (O'Connor 2010).

Une partie des microtubules provenant des centrosomes, les microtubules interdigités, s'associent de façon antiparallèle pour former le fuseau mitotique à la fin de l'anaphase (Mastronarde, McDonald et al. 1993). Dans cette région, un complexe essentiel pour la cytokinèse formé par la protéine MKLP1 (Mitotic Kinesin-Like Protein) et la « GTPase activating proteine » (GAP) CYK4 assure la bonne association des microtubules (Mishima, Kaitna et al. 2002). En effet, CYK4 est essentielle à la formation du fuseau mitotique et pour compléter la division cellulaire (Jantsch-Plunger, Gonczy et al. 2000).

La deuxième population de microtubules regroupe les microtubules astraux qui ont des attachements directs à la membrane. Ces microtubules peuvent interagir avec des protéines membranaires comme la dynéïne et la dynactine (Busson, Dujardin et al. 1998). Il existe encore beaucoup de controverse sur le rôle de ces microtubules dans la division cellulaire.

Finalement, les microtubules kinétochoriens lient les chromosomes. Pendant la prométaphase, la membrane nucléaire se fractionne (Stafstrom and Staehelin 1984) et donne accès à l'ADN aux microtubules. Ces microtubules sont très dynamiques et suivent un processus de catastrophe et construction jusqu'à ce qu'ils trouvent et attachent un chromosome (Inoue and Salmon 1995). Entre les chromosomes et les microtubules se forme une structure appelée le kinetochore, un complexe de protéines responsable de l'attachement approprié des microtubules aux centromères des chromosomes. Un modèle récent suggère que les kinetochores ont plusieurs points d'attache aux microtubules ce qui permettrait d'attacher constamment les microtubules et maintenir les forces (Gonen, Akiyoshi et al. 2012). L'attachement des microtubules aux kinetochores est régulé par les cyclines A et B (Kabeche and Compton 2013) et cette régulation est indispensable pour éviter des irrégularités génomiques causées par les mauvais attachements des kinetochores aux chromosomes (Bakhoum, Thompson et al. 2009).

- La métaphase

Même si les cellules sont attachées à un substrat ou à une couche des cellules, elles s'arrondissent complètement avant d'entrer en métaphase. L'arrondissement des cellules pendant la métaphase est essentiel pour le positionnement approprié du fuseau mitotique ainsi que pour la ségrégation adéquate des chromosomes (Lancaster, Le Berre et al. 2013). Pendant la métaphase, les chromosomes s'alignent à l'équateur de la cellule formant la plaque équatoriale. Cet alignement est possible grâce aux mouvements oscillatoires des chromosomes dus aux agents de dépolymérisation des microtubules et à la stabilité des chromatides sœurs (Jaqaman, King et al. 2010). Une fois que les chromosomes sont bien alignés à l'équateur, l'anaphase commence.

- L'anaphase et la télophase

Au début de l'anaphase, les cohesines qui liaient les chromatides sœurs sont dissoutes ce qui permet la ségrégation des chromatides sœurs aux pôles opposés de la cellule (Uhlmann, Lottspeich et al. 1999). Pendant la télophase, l'enveloppe nucléaire commence à se former dans chaque cellule sœur une fois que les chromosomes sont bien séparés. Ceci permet la séparation des chromosomes du cytoplasme et ils commencent à se décondenser pour prendre la forme finale du noyau.

- La cytokinèse

La cytokinèse est le processus par lequel les cellules filles séparent leur cytoplasme. Pendant l'anaphase se forme l'AC, une structure dynamique composée principalement des filaments d'actine et de la protéine motrice Myosine (Glotzer 2005), qui dirige la constriction à l'équateur de la cellule. Par la suite, un anneau du midbody (AM) plus stable gère la séparation des cellules filles. Il n'est encore pas tout à fait clair comment le recrutement des protéines de l'AC commence. Il fut un temps où l'on pensait que le signal qui déclenchait la contraction dans la région équatoriale venait des chromosomes. Cette hypothèse fut contrariée par les expériences de Rappaport sur des œufs d'oursin plat (*Dendraster excentricus*) en 1961. Il a physiquement perturbé les œufs d'oursin plat avec une sphère en vitre pour créer une perforation au milieu de l'œuf ce qui forçait la formation du sillon de clivage d'un côté

de la perforation. Lors de la deuxième division, deux sillons de clivage se sont formés à la place où les chromosomes étaient mais une troisième zone de constriction est apparue là où il n'y avait pas de chromosomes. Pour conclure, Rappaport suggère que dans une cellule contrôle, la position du sillon de clivage pourrait être déterminée par la zone de superposition des microtubules astraux (Rappaport 1961).

Aujourd'hui, les trois modèles qui essayent d'expliquer comment les composants de l'AC sont recrutés sont les suivants: le modèle de la stimulation du fuseau mitotique, le modèle de la stimulation astrale et le modèle de la relaxation astrale (Figure 4). Le premier suggère que CYK4 interagit avec MKLP1 pour maintenir la stabilité des microtubules dans le fuseau mitotique et par la suite CYK4 recrute et active des éléments qui iront au cortex via des microtubules astraux. En effet, CYK4 est responsable de la localisation du «Guanine exchange factor» (GEF) ECT2 (Yuce, Piekny et al. 2005), une protéine très importante pour la cytokinèse (Tatsumoto, Xie et al. 1999) et pour l'accumulation de la petite GTPase RhoA au sillon de clivage (Kimura, Tsuji et al. 2000). L'activation de RhoA mène au recrutement des autres composantes de l'AC. Le modèle de la stimulation astrale suggère qu'une population particulière des microtubules astraux envoie des signaux positifs à la partie équatoriale de la cellule pour induire la formation de l'AC (Devore, Conrad et al. 1989). Finalement, le modèle de la relaxation astrale suggère que les microtubules astraux envoient des signaux négatifs dans tout le cortex de la cellule sauf à l'équateur ce qui permet l'activation localisée de Rho A à l'AC et donc la contraction équatoriale (White and Rao 1983).

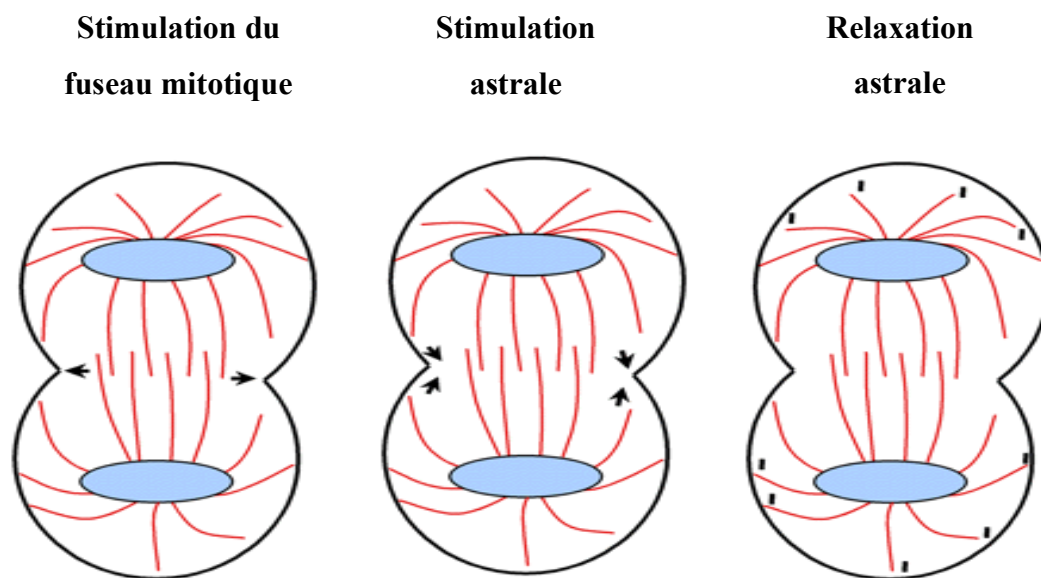


Figure 4: Représentation schématique des trois modèles du recrutement des composants de l'AC. Les trois modèles qui essaient d'expliquer le recrutement des composants de l'AC sont: le modèle de la stimulation du fuseau mitotique, le modèle de la stimulation astrale et le modèle de la relaxation astrale. Adapté de (Oliferenko, Chew et al. 2009)

L'AC est une structure complexe très dynamique dont le joueur principal est Rho A, une petite GTPase indispensable pour la cytokinèse. Une régulation robuste de RhoA est essentielle pour la contraction adéquate de l'AC (Kishi, Sasaki et al. 1993). En effet, l'activation de RhoA déclenche une réorganisation du cortex d'actine et de Myosine par l'activation et un recrutement de plusieurs protéines au cortex équatorial ce qui permet la contraction initiale de l'AC (O'Connell, Wheatley et al. 1999).

RhoA se trouve dans le cortex cellulaire, mais est activée seulement dans une zone restreinte à l'équateur où se forme l'AC (Bement, Benink et al. 2005). Il n'est toujours pas clair comment RhoA est activée pendant la cytokinèse. Cependant, un modèle qui essaye d'expliquer le mode d'action de RhoA suggère qu'il ne s'agit pas

seulement d'une activation limitée de Rho à la zone de contraction mais plutôt un cycle entre l'état activé à l'état inactivé (Bement, Miller et al. 2006). Comme il a déjà été mentionné, les Rho GEFs sont responsables de l'activation de RhoA. En effet, chez la drosophile, des mutants du Rho GEF pebble ne réussissent pas à localiser des composants importants comme l'Anilline, l'actine ni les septines à l'AC (Prokopenko, Brumby et al. 1999). Malgré l'identification précise des GEF nécessaires pour la cytokinèse, actuellement il n'y a pas beaucoup d'information sur les GAP de Rho pendant la cytokinèse. Récemment, une nouvelle GAP a été identifiée chez des cellules humaines et pourrait être responsable de l'inactivation de Rho pendant la cytokinèse et contrôlée par les microtubules (Zanin, Desai et al. 2013). Néanmoins, il n'existe pas d'orthologue de cette protéine chez la drosophile, ce qui suggère qu'il devrait avoir une autre GAP responsable de l'inactivation de Rho ou un autre mode d'action par Rho A pendant la cytokinèse. D'autre part, chez la drosophile la protéine RacGAP Tumbleweed (Tum) est essentielle pour l'organisation appropriée du fuseau mitotique (Zavortink, Contreras et al. 2005). Il y a peu d'évidence d'un rôle de Tum dans le positionnement de composants de l'AC. Cependant, il pourrait être un candidat pour maintenir le cycle d'activation/inactivation de Rho.

Les différentes protéines qui interagissent directe ou indirectement avec Rho et qui sont localisées à l'AC sont les suivantes (Figure 5 et 6) :

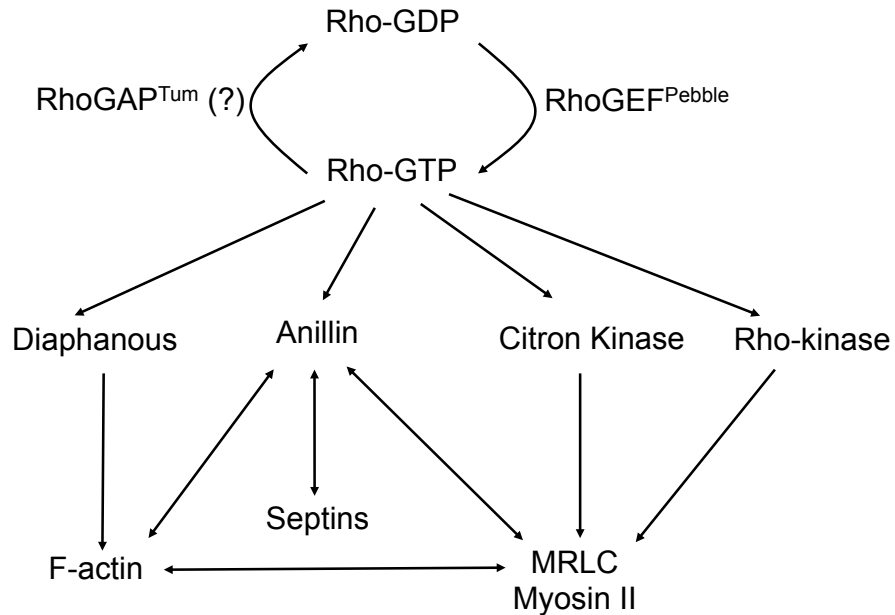


Figure 5: Réseau des possibles interactions entre les protéines dépendantes de Rho impliquées dans la formation de l'AC. Rho cycle entre les états activé/inactivé par l'effet des Rho GEFs et GAPs et lorsqu'elle est liée à du GTP est capable d'activer Diaphanous qui gère la nucléation d'actine, la kinase Citron et la kinase Rho qui modulent l'activation de la Myosine et l'Anilline qui sert d'échafaudage entre l'actine, les Septines et la Myosine

- Anilline : L'Anilline est une protéine qui est localisée dans le noyau en interphase, au cortex pendant métaphase et à l'équateur pendant la cytokinèse (Field and Alberts 1995). En effet, à la suite de la réalisation d'un criblage par ARN interférence (ARNi), la protéine Anilline est sortie comme une protéine qui affecte la cytokinèse. L'Anilline est considérée comme une protéine d'échafaudage puisqu'elle est capable de se lier avec plusieurs éléments de l'AC : l'actine, la Myosine, la GTPase Rho, les septines, la membrane plasmique ainsi qu'avec des éléments du fuseau mitotique comme les microtubules, Cyk4 et ECT2 (Kinoshita, Field et al. 2002; Piekny and Glotzer 2008; Piekny and Maddox 2010). L'Anilline peut lier des filaments actine directement (Field and Alberts 1995) ou par l'interaction avec la formine

Diaphanous (Dia) (Watanabe, Okawa et al. 2010). Des travaux avec des troncations d'Anilline démontrent que cette protéine lie du côté N terminal le cortex d'actine et Myosine, mais c'est du côté C terminal qu'elle va lier la membrane plasmique par les septines (El Amine, Kechad et al. 2013). Ceci suggère que l'Anilline travaille comme agent de liaison du cortex et de la membrane pour permettre la contraction adéquate de l'AC, étant important pour sa transition à l'AM.

- La kinase Citron : La kinase citron est une protéine capable de phosphoryler la Myosine (Yamashiro, Totsukawa et al. 2003). Cette kinase se localise à l'AC ainsi qu'à l'AM (Madaule, Eda et al. 1998) et est nécessaire pour les dernières étapes de la cytokinèse (Naim, Imarisio et al. 2004). Plus récemment, il a été montré que la kinase citron est aussi essentielle pour le recrutement et la distribution appropriée de RhoA, Anilline et les septines à l'AC ainsi qu'à maintenir KIF14 et PRC1 à l'AM (Bassi, Verbrugghe et al. 2011; Watanabe, De Zan et al. 2013). Une étude récente suggère que la kinase Citron serait importante dans la maturation de l'AM (El Amine, Kechad et al. 2013).
- Septines : Les septines sont des protéines hautement conservées qui possèdent un domaine de liaison au GTP et servent comme protéines d'échafaudage. Elles interagissent entre elles pour former des complexes qui peuvent ensuite s'assembler et former des anneaux et des filaments hautement organisés (Kinoshita, Field et al. 2002). Elles sont recrutées dans l'AC par le domaine PH (« Pleckstrin Homology ») de l'Anilline (Field, Coughlin et al. 2005) où elles lient les structures riches en actine (Kinoshita, Kumar et al. 1997) et forment un anneau qui permet l'assemblage du restant des composants et sont donc indispensables à la cytokinèse (Dobbelaere, Gentry et al. 2003). Selon l'espèce, on retrouve de 2 à 14 gènes codant pour des septines (Weirich, Erzberger et al. 2008). Chez la drosophile, la septine pnut est essentielle pour permettre la perte de membrane plasmique lors de la maturation de l'AM (El Amine, Kechad et al. 2013). La septine Sep2 joue un rôle important lors de l'activation de la Myosine, car elle facilite l'interaction entre les filaments de Myosine et leurs

activateurs (Joo, Surka et al. 2007). Ainsi, les septines pourraient avoir un rôle important dans la division cellulaire.

- **Dia** : Dia est une formine responsable de la production des filaments d'actine non ramifiés (Young and Copeland 2010). C'est une protéine activée par le lien Rho-GTP et elle reste attachée au filament d'actine lors de son élongation. Il a été démontré que Dia est essentielle à la division cellulaire (Castrillon and Wasserman 1994). Nous allons étudier plus en détail Dia dans la section 1.3.
- **Myosine et Actine** : L'AC contient des filaments d'actine qui interagissent avec la protéine motrice Myosine (Schroeder 1973). L'actine et la Myosine interagissent avec des protéines en aval de RhoA comme citron kinase, ROCK, et la formine Dia. La Myosine est premièrement recrutée à l'AC par ses domaines non moteurs (Zang and Spudich 1998) et ceci est possible chez la drosophile grâce à son interaction avec la «kinesin like protein» pavarotti (Adams, Tavares et al. 1998). La phosphorylation de la « myosin regulatory light chain » (MRLC), qui est connue pour induire l'activation de la Myosine, augmente dans l'AC pendant l'anaphase (DeBiasio, LaRocca et al. 1996). Néanmoins, un mutant non-phosphorylable de Myosine n'affecte pas la cytokinèse (Ostrow, Chen et al. 1994). Alors, ce n'est pas seulement la phosphorylation de la MRLC qui active la Myosine à l'AC. Ce sont les filaments de Myosine glissant sur les filaments d'actine qui génèrent les forces nécessaires pour contracter l'AC à l'équateur. Nous allons étudier plus en détail l'implication de l'actine dans la cytokinèse dans la section 1.2.

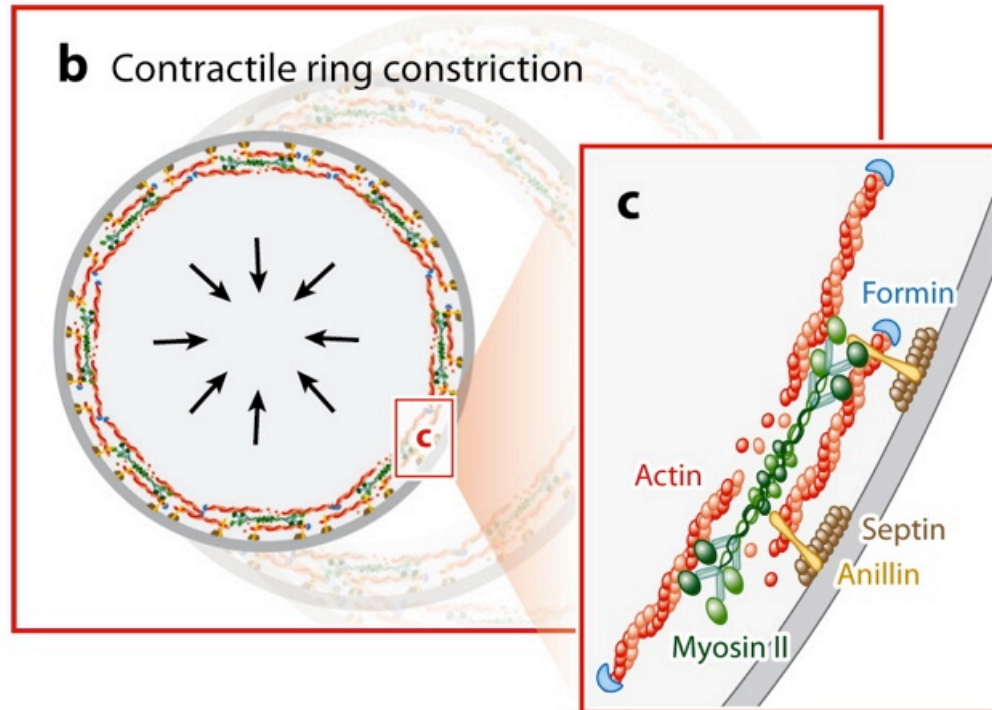


Figure 6: Représentation schématique des protéines dans l'AC. Réorganisation des protéines dans le cortex cellulaire à l'équateur cellulaire : des filaments d'actine nucléés par les formines interagissent avec la Myosine et la protéine d'échafaudage Anilline qui lie aussi les filaments de septines. Adaptée de (Green, Paluch et al. 2012)

La contraction équatoriale de la cellule commence quand les composants de l'AC sont bien recrutés et positionnés. Rendu à un diamètre critique, l'AC dynamique se transforme en une structure plus stable, l'AM. L'AM contient les microtubules du fuseau mitotique compactés (Mullins and Biesele 1977) et gère l'éventuelle séparation des deux cellules sœurs (Steigemann and Gerlich 2009). Plusieurs modèles suggèrent l'implication de différentes composantes de l'AC comme l'Anilline (Kechad, Jananji et al. 2012) dans la transition de l'AC à l'AM. Une addition de membrane est faite par des vésicules fusionnées à la membrane équatoriale pendant la maturation de l'AM (Bluemink and de Laat 1973; Lecuit and Wieschaus 2000). D'autre part, des portions de membrane sont internalisées ou expulsées de l'équateur ce qui pourrait expliquer la

diminution du diamètre et permettent la clôture de l'anneau (El Amine, Kechad et al. 2013) (Figure 7).

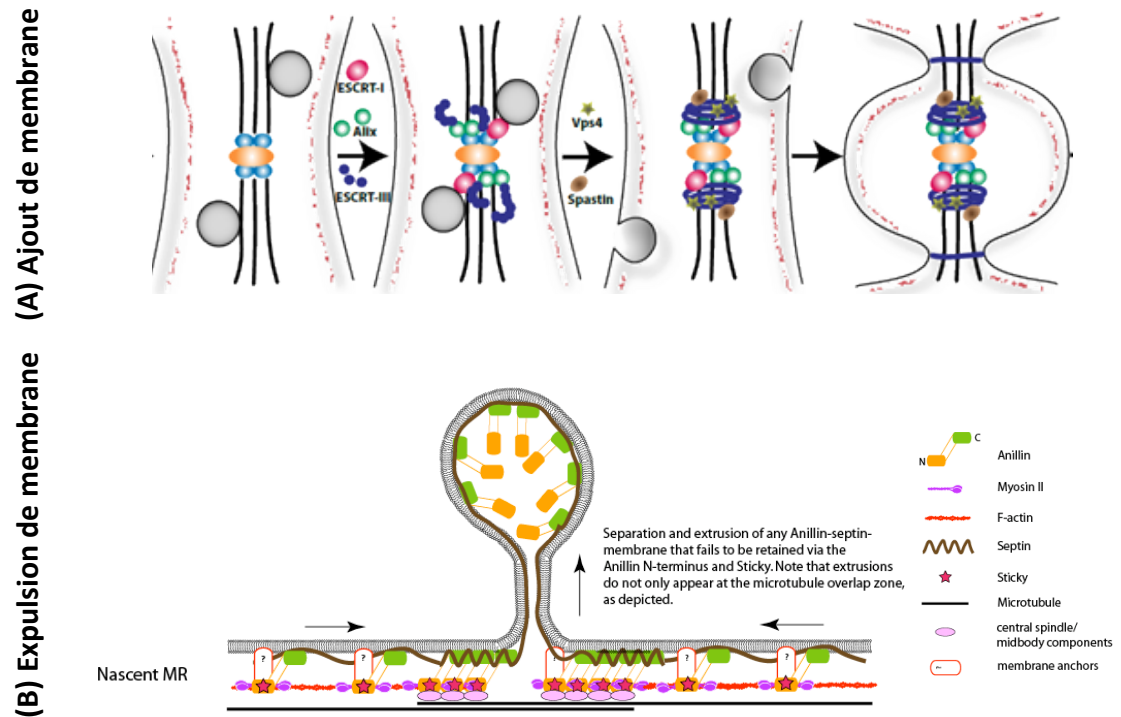


Figure 7: Modèles qui expliquent la maturation de l'AM. Les deux modèles qui expliquent la maturation de l'AM sont l'ajout de membrane par des vésicules (A) ou l'expulsion de membrane par contraction de l'AM (B) Adapté de (Huret, Ahmad et al. 2013) et (El Amine, Kechad et al. 2013)

Lors de l'abscision, une force mécanique est augmentée ce qui pourrait expliquer une séparation par déchirement (Burton and Taylor 1997). Des filaments en hélice de la protéine ESCRTIII (« Endosomal Sorting Complex Required for Transport ») autour de l'AM sont responsables de la diminution du diamètre équatorial (Guizetti, Schermelleh et al. 2011). Cependant, une augmentation des vésicules par le Golgi et le réticulum endoplasmique suggère une séparation par adition de nouvelle

membrane (Gromley, Yeaman et al. 2005). Le mécanisme d'abscision reste à être éclairci.

1.1.4 Le contrôle de la division cellulaire

Pour passer d'une phase à l'autre du cycle cellulaire, la cellule doit générer le signal adéquat via les points de contrôle. Ces points de contrôle permettent le passage à la prochaine phase du cycle cellulaire seulement quand la cellule est prête afin d'éviter des erreurs menant à une division aberrante. La régulation temporelle se fait via des kinases dépendantes des cyclines (Cdk, Cyclin dependent kinase). Les Cdk phosphorylent leurs substrats lorsqu'ils sont activées. Pour activer les Cdk, l'interaction avec leurs cyclines respectives est essentielle. En effet, les niveaux de Cdk sont stables pendant la division cellulaire, mais ce sont les niveaux des cyclines, phosphatases et kinases qui contrôlent et activent les Cdk au bon moment (Figure 8). Pendant le cycle cellulaire, il y a 3 points de contrôle principaux (Morgan 2007):

- Point de contrôle G1/S : les cyclines de la phase S et les cyclines G1/S sont activées quand les conditions sont adéquates pour la prolifération. Les Cdk activés à cette étape phosphorylent les substrats qui induiront la réplication de l'ADN.
- Point de contrôle G2/M : Le complexe de la cycline M-phase Cdk est activé pour induire la production du fuseau mitotique. Par exemple, les condensines seront activées ainsi que les protéines qui régulent les microtubules.
- Transition métaphase-anaphase : une fois que les chromosomes sont bien alignés à l'équateur et liés à un kinétochore, le complexe promoteur de l'anaphase (APC, « Anaphase Promoting Complex ») est activé. Ce point de contrôle retarde l'anaphase jusqu'à ce que les chromosomes soient bien positionnés et permet le début de la cytokinèse.

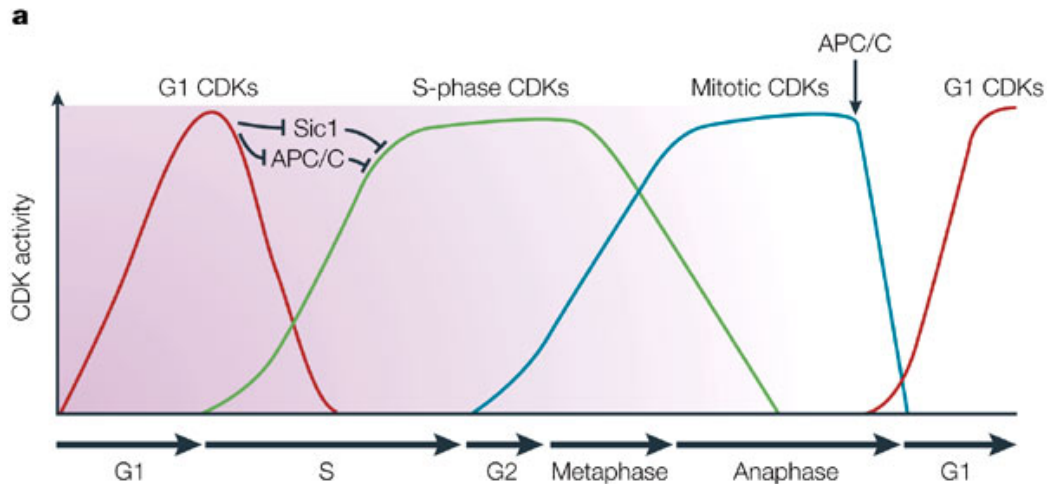


Figure 8: Le model classique du contrôle du cycle cellulaire. Pendant G1, G1Cdk induit la destruction de Sic1 et l'inactivation de APC/C ce qui permet l'entrée à la phase S jusqu'à l'activation de la Cdk mitotique. Adaptée de (Marston and Amon 2004)

1.1.5 Les organismes modèles pour l'étude de la division cellulaire

La division cellulaire est un processus très conservé entre les organismes eucaryotes, ce qui nous permet de l'étudier chez différents organismes afin d'exploiter leurs avantages expérimentaux. Les organismes les plus utilisés pour étudier la division cellulaire sont la levure, les embryons primitifs de certaines espèces, la mouche *Drosophila melanogaster*, le ver *Caenorhabditis elegans* et des cellules de mammifères en culture (Morgan 2007).

- Levure à bourgeon et levure à fission : Ce sont des mycètes qui poussent rapidement dans du milieu de culture. Étant des organismes unicellulaires avec un génome très simple il est facile de faire des modifications génétiques et d'étudier leur effet sur la division cellulaire.
- Embryons : Les œufs fertilisés de certaines espèces sont assez grands pour faciliter des études mécaniques et chimiques. Par exemple, il est très facile

d'injecter des substances directement dans des embryons de grenouille ou de physiquement déplacer le fuseau mitotique dans des œufs d'oursin plat.

- *Drosophila melanogaster* : La mouche de fruits est reconnue comme un modèle très important pour l'étude de la division cellulaire dans des tissus en croissance. En effet, une grande partie des gènes responsables de la division cellulaire ont été découverts chez la drosophile. C'est un modèle très facile à utiliser et qui aide à identifier des gènes essentiels par des croisements génétiques (Nusslein-Volhard and Wieschaus 1980). En plus de pouvoir étudier ces embryons, des cultures cellulaires sont aussi très reconnues pour l'étude de la division cellulaire. Une des plus utilisées sont les cellules de Drosophile S2 qui sont dérivées des embryons avancés de 20 à 24h (Schneider 1972). Ce sont des cellules semi-adhérentes qui ont des propriétés des macrophages et qui sont continuellement en division. La facilité de ce modèle est qu'il est très simple d'ajouter au génome des protéines fluorescentes et de réduire l'expression des protéines par ARNi. Lors de cette étude, nous avons travaillé avec des cellules de drosophile S2 (voir matériel et méthodes section 3.1)
- *Caenorhabditis elegans*: Les embryons de *C. elegans* sont très utilisés pour étudier la division cellulaire asymétrique à cause de leur taille et de la facilité de diminuer l'expression des protéines par ARNi. Les gonades de *C. elegans* sont aussi un bon modèle d'étude puisqu'elles sont formées par un syncytium, c'est-à-dire que toutes les cellules partagent le même cytoplasme. Lors de la déplétion de protéines par ARNi, les nouvelles cellules germinales vont prendre graduellement l'ancien produit protéique faisant un gradient de déplétion.
- Cellules de mammifères en culture : Les cellules de mammifère en culture comme les cellules HeLa ou des fibroblastes en culture sont typiquement utilisées lorsqu'on étudie une protéine connue pour avoir un effet sur des maladies humaines. Ce modèle d'étude permet d'extrapoler plus facilement les résultats à l'humain. Néanmoins les limites de ce modèle sont principalement le génome plus complexe et la difficulté de transfection et de diminution d'expression protéique par ARNi.

1.2 L'actine

En dessous de la membrane plasmique des cellules, il y a un cortex composé principalement d'actine, de Myosine et des protéines qui se lient à actine. Les filaments d'actine réticulée de ce cortex sont en constante réorganisation afin de permettre les changements de forme des cellules, la génération de forces ou la liaison de différentes protéines. Par exemple, pendant la division cellulaire, les cellules doivent premièrement doubler leur volume cytoplasmique, par la suite s'arrondir complètement pendant la mitose et contracter dans la zone équatoriale durant la cytokinèse. Toutes ces étapes ont besoin des changements dans le cortex d'actine.

L'actine est une des protéines les plus conservées chez les eucaryotes et elle existe sous deux formes : des monomères (G-actine) et des filaments (F-actine) qui sont formés à partir des monomères d'actine (Wegner 1976) (Figure 9).

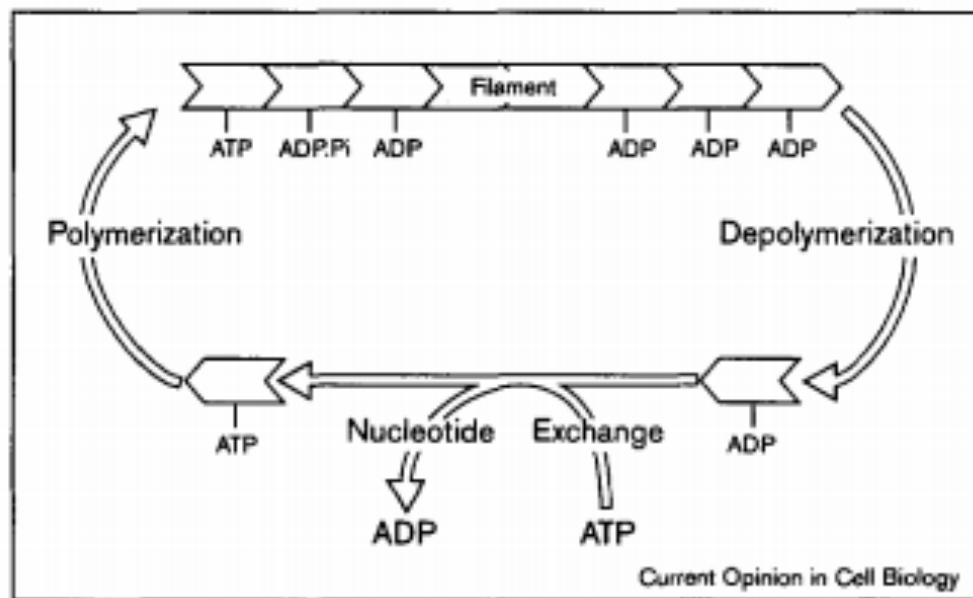


Figure 9 : Représentation schématique du cycle de l'actine. Les monomères d'actine libre échangent de l'ADP par de l'ATP pour se rajouter au filament d'actine. Une fois dans le filament les monomères hydrolysent leur ATP et quand le filament se dépolymérise les monomères d'actine libre sont liés à l'ADP (Carlier 1998).

1.2.1 Les filaments d'actine

Les filaments d'actine sont composés des monomères d'actine- β organisés de forme hélicoïdale. Cette organisation est dépendante du bon agencement des monomères d'actine. En effet, les monomères d'actine peuvent être divisés en quatre subdomaines qui changent de conformation lorsque la molécule se lie à l'ATP dans une fente qui se trouve entre les quatre domaines (Kabsch, Mannherz et al. 1990). Ce changement de conformation rend favorable l'interaction entre les monomères et permet la torsion classique des filaments (Holmes, Popp et al. 1990) (Figure 10).

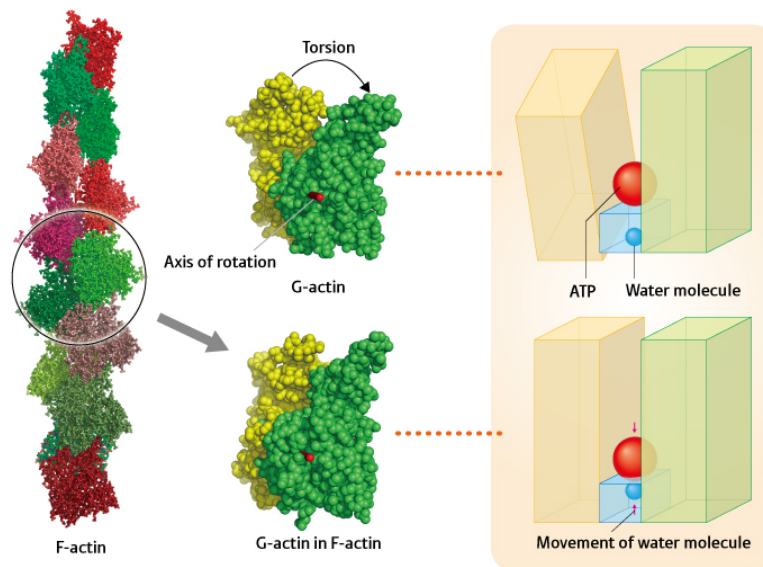


Figure 10: Représentation schématique du filament d'actine avec détail sur les conformations des monomères d'Actine. Le subdomaine de la G-actine lié à l'ATP change de position pour permettre l'hydrolyse de l'ATP par rapprochement à la molécule d'eau entre les deux subdomaines (Oda 2010).

Les filaments d'actine sont des structures polarisées, avec une extrémité barbée (+) et une extrémité pointue (-). Cette polarité est possible grâce au positionnement des monomères toujours avec la fente vers l'extrémité barbée. Les filaments sont capables

de se rallonger des deux côtés, mais le côté barbé est toujours plus rapide (Pollard 1986).

1.2.2 La nucléation vs polymérisation d'actine

Les filaments d'actine sont formés par deux processus successifs : la nucléation et la polymérisation. La nucléation est le processus d'initiation qui permet d'organiser les monomères d'actine en filaments pour permettre par la suite la polymérisation par addition des nouveaux monomères au filament. Les dimères d'actine sont très instables, alors il est indispensable d'avoir un «noyau» d'au moins trois monomères d'actine pour l'assemblage adéquat d'un filament d'actine (Sept and McCammon 2001). La purification des monomères d'actine mène à une nucléation spontanée des filaments d'actine, mais ceci est un processus très lent. Alors, la cellule a besoin des protéines nucléatrices d'actine pour accélérer ce processus et pouvoir aller aussi vite que la cellule a besoin des filaments. Plusieurs nucléateurs d'actine existent dans la cellule et produisent différents filaments d'actine (Figure 11).

- Le complexe Arp2/3: Le premier nucléateur d'actine à être identifié était le complexe de «Actin Related Protein 2/3» (Arp2/3). C'est un complexe de 7 protéines qui se lie à un filament d'actine déjà existant et commence la nucléation d'une rame d'actine à 70° (Blanchoin, Amann et al. 2000). Le complexe Arp2/3 est responsable de la nucléation de filaments d'actine ramifiées. Le complexe Arp2/3 semble être dispensable pour la cytokinèse, mais il est essentiel pour d'autres processus comme la production de lamellopodia, migration cellulaire, l'adhésion et la production des podosomes (Rotty, Wu et al. 2013).
- Spires : Les spires sont des protéines essentielles pour la polarisation des oocytes chez la drosophile. Ce n'était qu'en 2005 qu'il a été découvert qu'elles avaient aussi la capacité de polymériser des filaments d'actine. En effet, les spires contiennent des domaines d'homologie WASP (WH2) capables de lier et aligner quatre monomères d'actine afin de les stabiliser et d'impulser la polymérisation d'actine (Quinlan, Heuser et al. 2005).

- **Formines** : Les formines sont des protéines nucleatrices d'actine qui sont responsables de la formation de F-actine non ramifiée. Nous allons examiner plus en détail le mode de polymérisation d'actine par les formines dans la section 1.3.

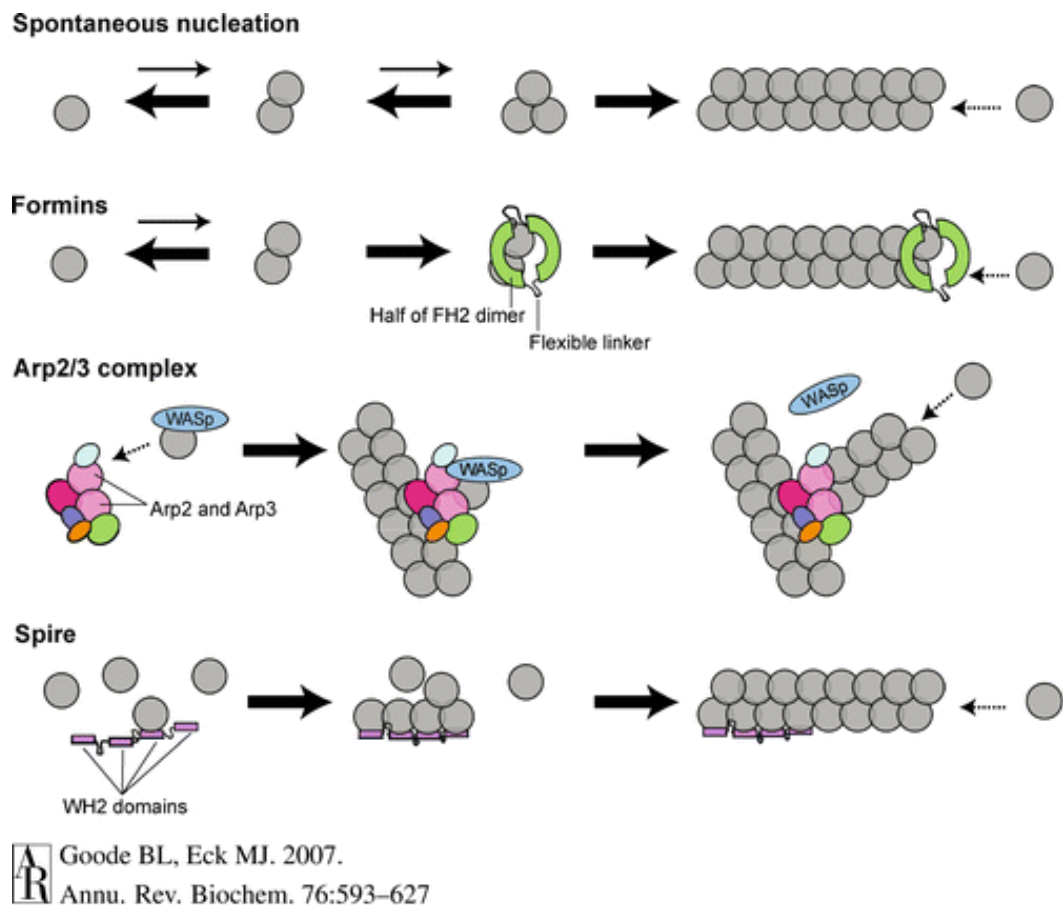


Figure 11: Comparaison des différents modes de nucléation d'actine. La nucléation spontanée des filaments d'actine à partir de G-actine est possible après la stabilisation de plus que trois monomères. La nucléation par les formines peut se faire à partir d'un dimère d'actine, la formine lie l'Actine par son domaine FH2 et reste attachée au filament pendant qu'il est polymérisé. Le complexe Arp2/3 lie un filament d'actine déjà formé et induit la polymérisation d'un filament à 70°. Les spires stabilisent quatre G-actines ce qui favorise la polymérisation spontanée. (Goode and Eck 2007)

1.2.3 Les protéines qui interagissent avec l'actine

La régulation et conformation du maillage d'actine dans le cortex ne dépendent pas seulement de agents de polymérisation. En effet, il y a plusieurs familles de protéines qui lient l'actine et dont leur rôle est résumé dans la Table I:

Table I: Familles des protéines qui lient l'actine. Adaptée de (Winder and Ayscough 2005)

Famille	Rôle	Exemples
Protéines de régulation	Ce sont des protéines capables de lier G-actine ADP afin de maintenir l'équilibre d'actine monomérique disponible dans le cytoplasme et de faciliter le recrutement de G-actine aux nouveaux filaments d'actine.	Twinfilin, Srv2/CAP, Profilin, WASP et ADF/cofilin
Protéines de réticulation	Ce sont des protéines qui lient deux filaments d'actine ou plus afin de créer un réseau robuste. Elles peuvent avoir deux domaines de liaison à l'actine ou plusieurs sous-unités avec un domaine de liaison par sous-unité	α -actinin, fimbrin, fascin et Anilline
Myosines	Les Myosines ce sont des protéines qui « marchent » sur l'actine pour produire des forces en hydrolysant ATP. Elles peuvent produire des forces de contraction ou aider à déplacer des vésicules sur les filaments d'actine.	> 17 sortes
Protéines de liaison à la membrane et au cytosquelette	Ce sont des protéines responsables de relier les différents composants du cytosquelette. Ces protéines ont un domaine de liaison à l'actine ainsi qu'un domaine qui lie d'autres composants comme les microtubules, les membranes, etc.	Dystrophin, Utrophin, Talin et Vinculin
Protéines de coiffage	Ce sont des protéines qui lient l'extrémité barbée afin d'éviter l'ajout des nouveaux monomères d'actine pour arrêter la croissance du filament.	Cap, Tropomodulin, Fragmin et Villimin

1.2.4 Drogues du cytosquelette spécifiques à l'actine

Plusieurs drogues naturelles qui lient l'actine sont capables d'altérer la polymérisation des filaments. Elles nous permettent d'observer l'effet des changements du cytosquelette d'actine sur différents processus. Ces substances peuvent être divisées en deux groupes : les drogues qui déstabilisent les filaments d'actine et ceux qui les stabilisent (Allingham, Klenchin et al. 2006).

Les drogues d'actine qui déstabilisent F-actine peuvent soit lier la G-actine et déstabiliser l'équilibre G-actine/F-actine ou lier directement le filament d'actine pour empêcher l'interaction. Par exemple, Latrunculin est une famille des molécules découvertes chez *Negombata magnifica* qui lie les monomères d'actine dans la fente et change leur conformation pour empêcher l'assemblage en filaments. La cellule détecte alors un manque de G-actine et les filaments se dépolymérisent. Latrunculine A (LatA) est une drogue très utilisée dans des cultures cellulaires pour dépolymériser les filaments d'actine. D'autres molécules comme la Swinholide, Lobophorolide et Scyptomysine lient la surface du filament d'actine à l'extrémité barbée.

Pour ce qui est des drogues qui stabilisent les filaments d'actine, elles lient directement le filament et empêchent sa dépolymérisation. Le stabilisateur d'actine le plus connu est la phalloïdine, une cytotoxine capable de lier le sous-domaine 4 d'une actine dans le filament avec le sous-domaine 4 de l'autre actine empêchant des mouvements ou séparations dans le filament. Lorsque conjuguée à la Rhodamine, la phalloïdine est utilisée comme marqueur des filaments d'Actine dans des cellules fixées. Un autre stabilisateur d'actine est la Jasplakinoline, une cytotoxine capable de stabiliser les filaments en plus d'augmenter sa polymérisation.

1.2.5 L'actine dans la division cellulaire.

Depuis 1975, Sanger a remarqué que le cytosquelette d'actine change pendant la division cellulaire. Il décrit l'actine dans des fibroblastes des poussins et remarque une répartition homogène pendant la métaphase suivie d'une accumulation d'actine dans l'AC qui se diffuse vers les pôles en télophase (Sanger 1975). Maintenant, la question qui se pose est : comment cette actine est-elle arrivée à l'AC? Les deux

propositions principales sont : l'actine afflue des pôles vers l'équateur ou l'actine est nucléée directement à l'AC.

L'hypothèse de l'afflux d'actine se base sur plusieurs observations chez des cellules de mammifères. Par exemple, en suivant les dynamiques des billes attachées à des récepteurs membranaires, on observe un afflux des pôles vers l'équateur (Wang, Silverman et al. 1994). Aussi, si on micro-injecte des filaments d'actine marqués avec de la phalloïdine (une toxine capable de lier l'actine, voir section 1.2.5), les amas d'actine fluorescente se déplacent vers l'équateur pendant la formation de l'AC (Cao and Wang 1990).

Pour ce qui est du modèle de la nucléation *de novo*, la polymérisation des nouveaux filaments d'actine est essentielle pour la cytokinèse. Dans la levure, la formine Cdc12, le complexe Arp2/3 et la profiline sont tous importants pour l'enrichissent d'actine à l'AC pendant la cytokinèse (Pelham and Chang 2002). Des résultats semblables ont été montrés chez l'embryon de *C. Elegans* (Severson, Baillie et al. 2002).

Les deux modèles arrivent à concilier que lors de la formation de l'AC il y a une augmentation d'actine à l'équateur. Cette actine serait essentielle pour la contraction appropriée de l'AC servant de base pour les filaments de Myosine ainsi que pour l'ancrage des différentes composantes au cortex. En effet, le traitement avec Latrunculine A (LatA, une drogue qu'inhibe la polymérisation d'actine, voir section 1.2.5) dans des cellules en métaphase induit le recrutement des composants de l'AC comme l'Anilline en structures organisées mais ils ne sont pas capables de finir avec succès la cytokinèse (Figure 12) (Hickson and O'Farrell 2008). Donc, l'actine est indispensable pour la formation adéquate de l'AC.

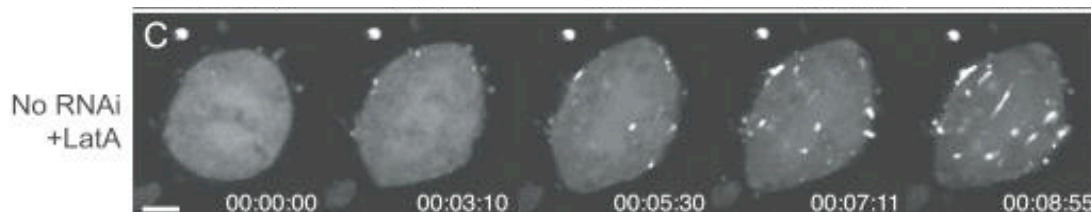


Figure 12: L'actine est indispensable pour organiser un AC capable de se contracter. Cellules de drosophile S2 exprimant Anilline-GFP traitées avec LatA. Les cellules dépourvues d'actine sont capables de recruter l'Anilline en structures compactes mais ne réussissent pas à se contracter. Adapté de (Hickson and O'Farrell 2008).

En ce qui concerne les dernières étapes de la cytokinèse, l'actine n'est pas nécessaire. Le traitement avec LatA n'affecte pas l'abscission chez des cellules humaines (Guizetti, Schermelleh et al. 2011). Plus précisément, des expériences non publiées de notre équipe montrent qu'en effet lors du traitement avec LatA dans les 20 premières minutes, suite à la formation de l'AM, les cellules ne sont pas capables de compléter la cytokinèse. À l'opposé, lors de l'inhibition de la polymérisation d'actine après ces 20 premières minutes, les cellules sont capables de bien finir la division cellulaire (Figure 13). Ceci suggère que, lors de la division cellulaire, la cellule passe d'une étape dépendante de l'actine à une étape indépendante de l'actine.

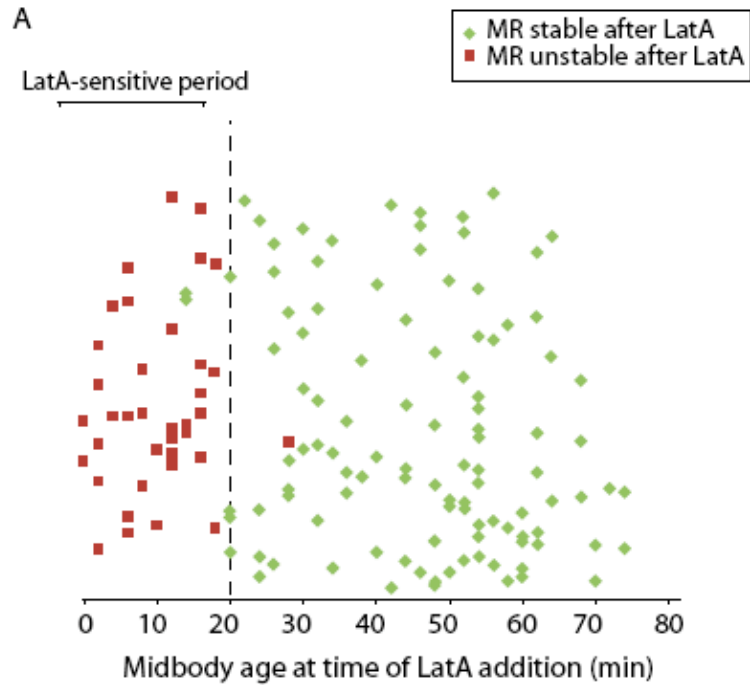


Figure 13: L'AM passe d'une étape sensible à l'actine à une étape non sensible à l'actine. Traitement des cellules de drosophile S2 avec Lat A ($1\mu\text{g/mL}$), chaque point représente une cellule qui a échoué la cytokinèse (points rouges) ou complété avec succès la cytokinèse (points verts). Si l'AM est âgé de moins de 20 minutes, la cellule ne peut pas compléter la cytokinèse. Après 20 minutes, l'AM n'est plus sensible à l'actine.

1.3 Diaphanous

Diaphanous (Dia) est une formine responsable de la nucléation des filaments d'actine non ramifiée essentielle pour la cytokinèse. Les formines sont des protéines qui partagent un domaine FH2 (« Formin homology ») qui leur permet de lier l'actine et d'initier la nucléation des filaments d'actine (Pruyne, Evangelista et al. 2002). Une grande famille des protéines reliées aux formines regroupe toutes les protéines qui contiennent une région poly-proline, nommée FH1, et le domaine FH2 (Figure 14).

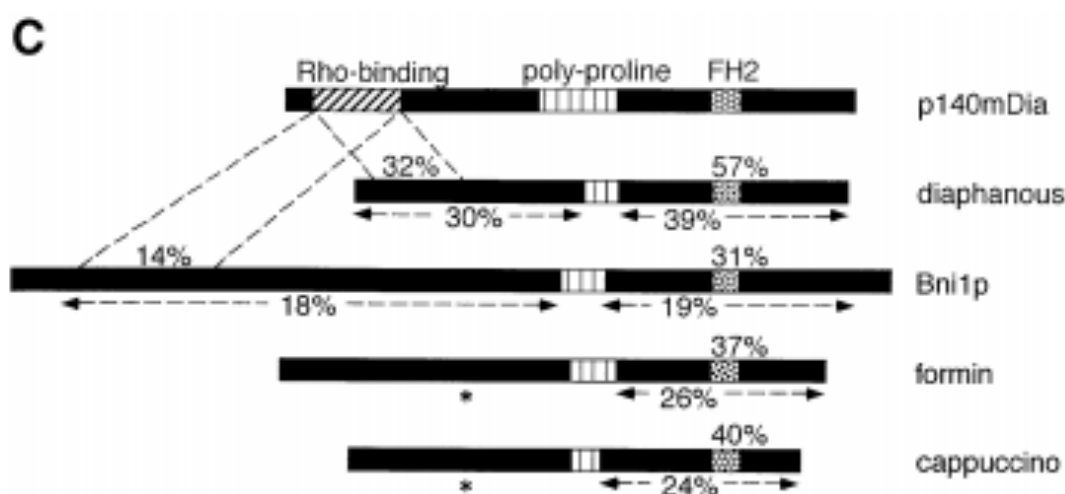
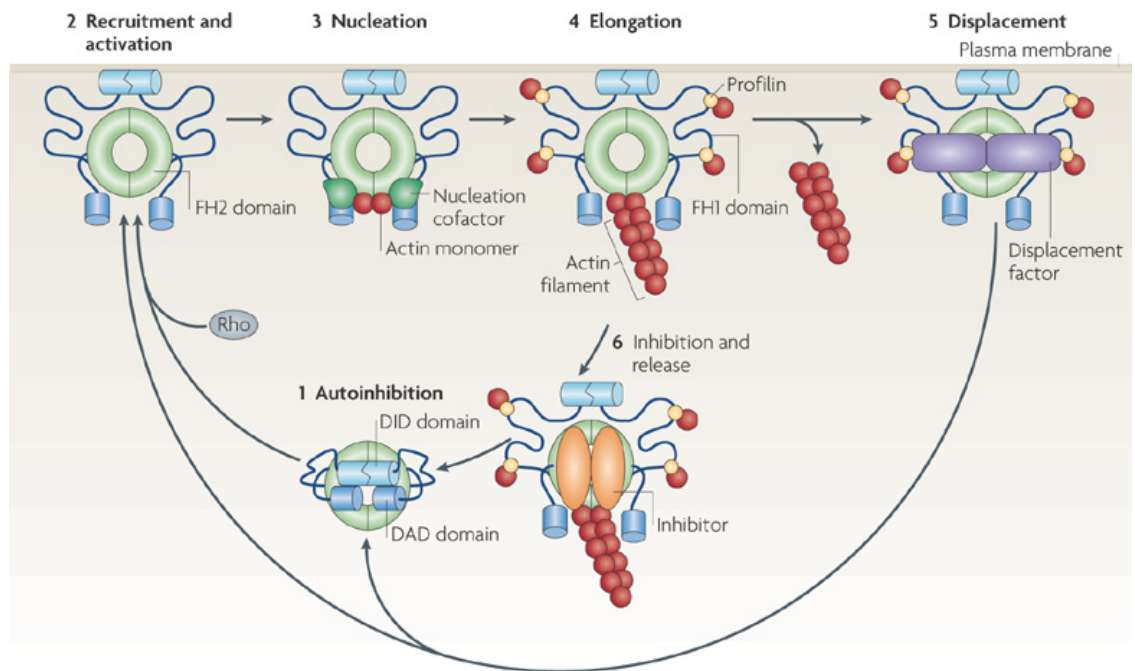


Figure 14: Exemples des structures des formines dans différentes espèces. L'homologie est représentée par le pourcentage d'acides aminés identiques par rapport à p140mDia. Adapté de (Watanabe, Madaule et al. 1997)

Chez la drosophile, six formines ont été trouvées : Dia, DAAM (« Dishevelled-Associated Activator of Morphogenesis »), Cappuccino, FHOD (« Formin Homology Domain containing protein »), INF (Inverted Formin), FRL (Formin Related gene in Leukocytes) (Higgs and Peterson 2005). La seule formine qui a été montrée comme indispensable pour la cytokinèse est Dia. Dia est une protéine dimérique qui contient

un domaine de liaison aux GTP ainsi qu'un domaine autorégulateur et un domaine inhibiteur. Le modèle de fonctionnement actuel propose que le domaine autorégulateur et le domaine inhibiteur interagissent ensemble quand la protéine n'est pas active. Au moment où Rho-GTP lie son domaine de liaison aux GTP, le domaine inhibiteur se déplace pour ouvrir la conformation de la protéine. Par la suite, le domaine d'homologie des formines 1 (FH1) commence à recruter la G-actine via une petite protéine, profiline. Finalement, le domaine FH2 commence à nucléer l'actine toujours restant attaché au filament d'actine (Figure 15) (Chesarone, DuPage et al. 2010).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 15: Représentation schématique du mode d'action des formines. (1) Auto inhibition par l'interaction des domaines DID et DAD. (2) Recrutement et activation par l'ouverture de la conformation de la protéine suite à l'interaction à des protéines activatrices. (3) Nucléation par la stabilisation de plus de 3 monomères d'actine. (4) Élongation par la recrutement des monomères d'actine par l'interaction du domaine FH1 avec les dimères profiline-actine (5) Déplacement par des facteurs de déplacement (6) Inhibition par l'interaction des inhibiteurs. (Chesarone, DuPage et al. 2010)

Chez les mammifères, il y a 3 isoformes de Dia qui ont des rôles différents. mDia 1 est responsable de la remodelation du cytosquelette, par exemple lors de l'activation des cellules T ainsi que de la migration cellulaire (Eisenmann, West et al. 2007). mDia 2 est essentielle pour la formation des filopode (Yand et al PLoS 2007) et pour la division cellulaire (Watanabe, Ando et al. 2008). Pour sa part, mDia 3 polymérise l'actine cytoplasmique et est involucrée dans l'alignement des chromosomes lors de la métaphase (Yasuda, Ocegüera-Yanez et al. 2004).

1.3.1 Dia dans la cytokinèse

La première évidence du rôle essentiel de Dia dans la cytokinèse date de 1993, quand Castrillon et al ont trouvé que des mutations dans le locus de Dia étaient responsables de la production des lignées de males stériles (Castrillon, Gonczy et al. 1993). En 1994, cette même équipe a fait un étude spécifique sur des mutants de Dia qui ont présenté des défauts dans la production des spermatides chez les males et dans les oocyte chez les femelles. En plus, des allèles nuls de Dia étaient létaux dans les étapes précoces du développement. Toutes ces observations étaient associées avec des problèmes dans la cytokinèse. Ils ont aussi identifié une section du gène qui était conservée dans différentes espèces (souris, poulet et levure) (Castrillon and Wasserman 1994).

Pour avoir un meilleur aperçu du rôle de Dia dans la cytokinèse, Afshar et al ont généré un mutant déficient de Dia chez la drosophile. Ils ont trouvé que Dia est essentielle à partir du cycle 11 de la cellularisation où ils ont commencé à voir des défauts dans le cytosquelette d'actine. En plus, ils ont observé des défauts dans l'organisation des chromosomes et dans l'invagination de la membrane en métaphase. Ils proposent que Dia puisse être une protéine qui lie le cytosquelette d'actine avec les microtubules puisqu'ils observent des défauts dans la protrusion des capes d'actine chez l'embryon (Afshar, Stuart et al. 2000). mDia2 localise spécifiquement à l'AC et à l'AM pendant la cytokinèse (Watanabe, Ando et al. 2008) (Figure 16). Même si Dia est essentielle à la cytokinèse et localise à l'AC, son rôle déterminé pendant la cytokinèse reste méconnu.

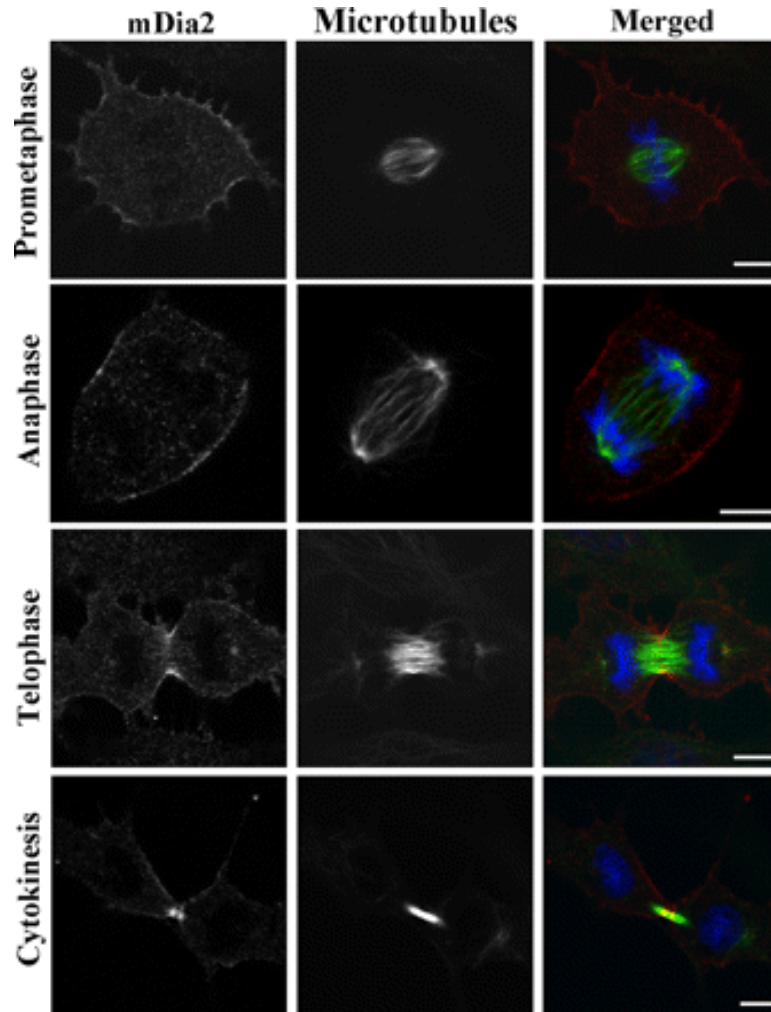


Figure 16: Localisation de Dia pendant la cytokinèse. Dia localise dans le cytoplasme en prométaphase, à la région équatoriale pendant l'anaphase et la cytokinèse. Cellules NIH 3T3 marquées pour mDia2 (Rouge), Microtubules (Vert) et l'ADN (Bleu). Échelle 5µm (Watanabe, Ando et al. 2008)

1.3.2 Dia dans les maladies

Vu leurs rôles dans la régulation du cytosquelette d'actine et dans la cytokinèse, les formines peuvent avoir une implication dans le développement des plusieurs maladies. En effet, la corrélation entre des cellules polyploïdes et le cancer date de 1929 quand Boveri a décrit l'apparition des cellules malignes à la suite des divisions avec plusieurs centrosomes. Aujourd'hui, il est clair que des cellules tétraploïdes issues

des défauts dans la cytokinèse ont des caractéristiques malignes responsables du développement du cancer. Par exemple, lors que l'on bloque la cytokinèse chez la souris, on trouve des cellules avec des défauts chromosomiques et qui ont une tendance plus élevée de générer des tumeurs (Fujiwara, Bandi et al. 2005), de là l'importance d'étudier la cytokinèse afin de comprendre quels facteurs pourraient être responsables des maladies.

Présentement, il n'existe pas d'évidence reliant directement les défauts de cytokinèse produits par Dia à des maladies. C'est plutôt les changements dans la motilité des cellules mutantes de Dia qui a été associée avec le cancer. En effet, mDia1 et mDia2 sont responsables de l'augmentation de la capacité de migration des cellules *in vivo* ce qui pourrait expliquer une augmentation des métastases (DeWard, Eisenmann et al. 2010). Néanmoins, sachant que des mutations de Dia produisent des échecs de cytokinèse, elle est une protéine potentiellement responsable des maladies issues des problèmes de cytokinèse.

1.3.3 Protéines qui interagissent avec Dia

Même si sa fonction primordiale est la polymérisation des filaments d'actine, Dia est aussi capable de lier d'autres protéines (Figure 17). Les protéines qui interagissent avec Dia sont les suivantes :

- Rho : La partie N-terminale de mDia interagit physiquement avec la petite GTPase Rho. Entre les acides aminés 571 et 737 il y a une région essentielle pour cette interaction qui est hautement conservée avec l'homologue de mDia chez la drosophile (Watanabe, Madaule et al. 1997). La localisation de Dia à l'AC dépend de cette interaction (Watanabe, Okawa et al. 2010).
- Anilline : Dia et Anilline interagissent par leurs domaines N-terminaux. L'interaction d'Anilline avec mDia2 entre en compétition avec l'autorégulation du DID avec DAD et ceci favorise le recrutement de Dia à l'AC (Watanabe, Okawa et al. 2010)

- Microtubules : Les domaines FH1 et FH2 de Dia peuvent stabiliser des microtubules en empêchant la dépolymérisation *in vitro*. De plus, cette interaction est indépendante de la nucléation d'actine par Dia puisque un mutant incapable de lier l'actine est toujours capable de lier les microtubules (Bartolini, Moseley et al. 2008).
- Profiline : Profiline est une petite protéine qui est capable de lier à la fois des monomères d'actine et le domaine FH1 des formines. En effet, pendant la polymérisation d'actine *in vitro*, l'ajout de profiline augmente la vitesse de polymérisation et l'hydrolyse d'ATP dans l'actine n'est plus essentielle (Kovar, Harris et al. 2006).
- Adenomatous polyposis coli : mDia2 est considérée comme une protéine d'échafaudage entre adenomatous polyposis coli et EB1 pour stabiliser les microtubules pendant la cytokinèse (Wen, Eng et al. 2004). L'interaction de Dia avec adenomatous polyposis coli stimule la nucléation des filaments d'actine chez la drosophile (Jaiswal, Stepanik et al. 2013).
- Kinetochores : mDia3 maintient la stabilité et alignement des microtubules par son interaction avec Adenomatous polyposis coli et EB1 ce qui maintient la liaison des kinetochores aux chromosomes (Yasuda, Ocegüera-Yanez et al. 2004).

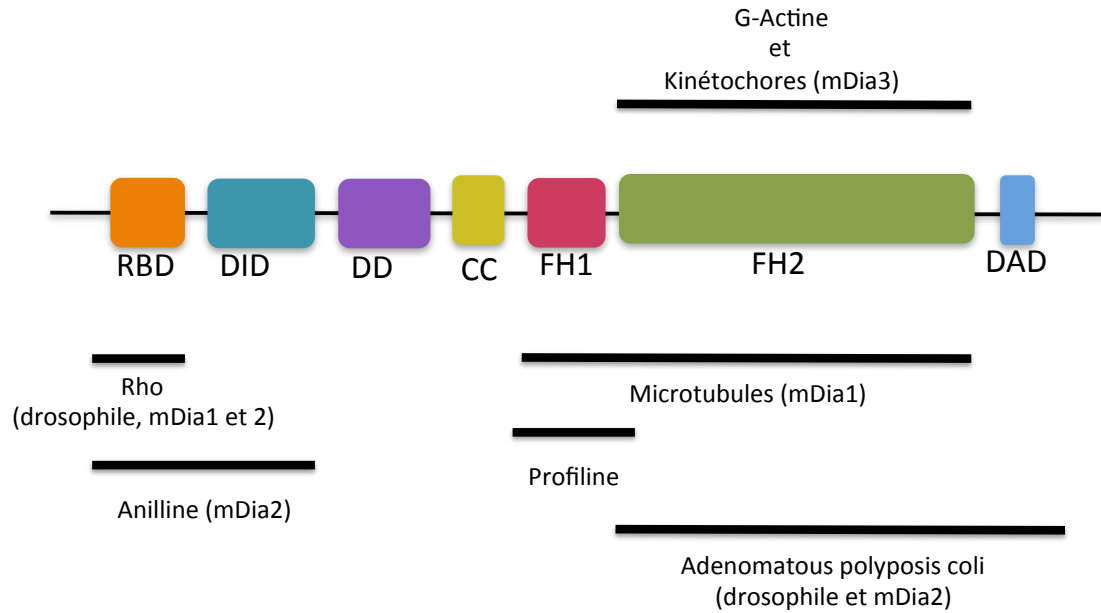


Figure 17: Résumé des protéines qui interagissent avec Dia. Le N-terminale de Dia lie Rho et l'Anilline tandis que le C-terminale lie l'actine, les kinétochores, les microtubules, la profiline et l'adenomatous polyposis coli. RBD : Rho Binding Domain; DID : Diaphanous Inhibitory Domain, DD : Dimerization Domain; CC : Coil-coiled; FH : Formin Homology, DAD : Diaphanous Autoregulatory Domain.

2 Project de Recherche

2.1 Problématiques et hypothèses

Selon les modèles actuels, Dia produit les filaments d'actine essentiels pour l'AC. Cependant, ces modèles ne réussissent pas à réconcilier les observations, dans plusieurs espèces, que la perte de Dia ne semble pas inhiber la formation de l'AC, mais mène à un échec de la cytokinèse après l'ingression du sillon de clivage. Donc, même si c'est clair que Dia est essentielle pour la division cellulaire, et qu'elle produit des filaments d'actine, son rôle précis pendant la cytokinèse reste à être déterminé.

L'hypothèse principale de ce projet est que Dia régule la transition de l'AC à l'AM pendant la cytokinèse. Plus spécifiquement, nous proposons que Dia empêche la transformation de l'AC à l'AM jusqu'à l'étape où l'AM stable doit se former.

2.2 Procédures expérimentales et objectifs.

Pour tester notre hypothèse, nous avons fait une caractérisation fonctionnelle de Dia pendant la cytokinèse. Nous utilisons la microscopie de haute résolution en temps réel pour suivre le comportement dynamique de protéines marquées par fluorescence dans des cellules de Drosophile S2. Nous étudions les cellules de drosophile S2, un modèle très pratique pour l'étude de la division cellulaire. Premièrement, la drosophile a un génome très simple; par exemple, chez les mammifères nous trouvons 3 isoformes de Dia pendant que chez la drosophile il y en a seulement une. En plus, il est très facile de transfecter ces cellules avec des protéines fluorescentes et créer des lignées cellulaires stables pour les suivre avec la microscopie en temps réel. Finalement, il est possible de réduire l'expression des protéines spécifiques en utilisant des ARNi longs double brin (ARNdb). Cette approche expérimentale nous permet de marquer les protéines impliquées dans la cytokinèse, de réduire l'expression d'une protéine particulière et voir son effet dans toutes les étapes de la division cellulaire par microscopie.

Les objectifs particuliers de ce projet sont :

(1) Documenter l'effet de l'inhibition de Dia par ARNdb dans la cytokinèse : Nous avons généré 4 ARNdb contre différentes régions de Dia afin de déterminer l'effet d'une diminution de Dia dans des lignées cellulaires exprimant d'autres composants de l'AC marquées avec une protéine fluorescente.

(2) Étudier le comportement dynamique de Dia dans l'AC et l'AM : Nous avons suivi le comportement de Dia pendant la formation de l'AC et l'AM dans des cellules non traitées et dans des cellules traitées avec LatA.

(3) Étudier l'implication de la nucléation d'actine par Dia dans la cytokinèse : Nous avons généré une protéine fluorescente capable de lier des filaments d'actine afin de suivre le comportement dynamique de l'actine suite à une déplétion de Dia et de voir à quel point Dia est responsable de la nucléation d'actine dans l'AC.

3 Matériel et Méthodes

3.1 Lignées cellulaires et constructions

Les lignées cellulaires ont été produites suite à des transfections de plasmides avec des protéines fluorescentes inductibles (pMT) ou sous le promoteur d'actine05C (pAc) dans des cellules de Drosophile S2. Les cellules S2 ont été mises en culture une journée avant de faire la transfection dans une plaque de 24 puits en plastique (Falcon). Un mélange a été fait avec les ADN et du pCoHygro (Invitrogen) dans du milieu Schneider 1X (Gibco) sans sérum, ainsi qu'un mélange de Cellfectin II Reagent (Invitrogen) dans du milieu sans sérum qui ont été incubées pendant 15 à 20 minutes à la température ambiante. Le mélange de Cellfectin a été mis avec le mélange d'ADN dans un ratio de 1/8 et ce nouveau mélange a été incubé 30 minutes. Le milieu des cellules a été changé par du milieu sans sérum, et suite aux 30 minutes d'incubation, ce milieu a été changé par le nouveau mélange de celfectine et ADN. Les cellules ont été incubées 3 à 4 heures dans ce mélange qui a été remplacé après par du milieu complet. Les cellules ont été mises en culture dans du milieu avec hygromicine B (Invitrogen, 50mg/mL) après 48h pour faire la sélection pendant 4 semaines. À la fin de cette période, les cellules ont été passées à un milieu complet et passées chaque semaine dans du milieu avec FBS et Penicilline Streptomycine frais à un ratio de 1/10 dépendant de la confluence.

Pour les constructions des protéines fluorescentes, la séquence de la protéine a été introduite dans le vecteur pENTR-D-TOPO selon les instructions de la compagnie (Invitrogen). Deux troncations de Dia ont été faites : une qui contient seulement le domaine RBD et une qui contient FH1 et FH2 (les derniers 1947 pb). Les amorces utilisées pour amplifier les morceaux désirés étaient les suivantes :

Table II: Séquences des amorces utilisées pour faire les tronctions de Dia RBD et FH1FH2

DiaRBD	Primer F	CACCATGTCTCGTCACGAGAAAACG
	Primer R	GTAGCCATTCCGCTCATAGAC
DiaFH1FH2	Primer F	CACCGTCTATGAGCGGAATGGCTAC
	Primer R	CGCGGAGCCTAGAACCTC

La plupart des formes d'actine fluorescente ne sont pas capables d'être polymérisées par les formines. Comme le sujet principal de cette recherche est une formine, nous avons construit LifeAct, une protéine qui lie les filaments d'actine et n'interfère donc pas avec leur polymérisation (Riedl, Crevenna et al. 2008). Une hybridation d'oligomères a été faite à partir des amorces complémentaires suivantes :

Table III: Séquence des amorces d'hybridation pour la construction de LifeAct

LifeAct_F	CACCATGGGTGTCGCAGATTTGATCAAGAAATTCGAAAGC ATCTCAAAGGAAGAA
LifeAct_R	TTCTTCCTTTGAGATGCTTTCGAATTTCTTGATCAAATCTG CGACACCCAT

Pour l'hybridation, des volumes égaux des amorces complémentaires à une concentration de 4 μ M ont été mélangés et mis dans un bain à 95°C pendant 5 minutes. Ils ont été refroidis à la température ambiante pendant une heure. Le produit final a été recombiné dans le vecteur pENTR-D-TOPO suivant les instructions de la compagnie (Invitrogen).

3.2 Génération de l'ARNdb

Les ARNdb ont été générées *in-vitro* suite à deux PCR consécutifs (Foley and O'Farrell 2004). Une première PCR est faite à partir de l'ADN des clones de Dia (Flybase; Drosophila Genetic Resource Center) en utilisant les paires d'amorces dans le tableau X qui contiennent tous une séquence initiale riche en GC (5'-GGGCGGGT). Par la suite, la première PCR est amplifiée en utilisant des amorces universelles qui contiennent la séquence du promoteur de la polymérase d'ARN T7 suivie par la même séquence riche en GC (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGGGCGGGT). Finalement, à partir de la matrice d'ARN, une réaction de transcription *in-vitro* s'est faite pendant la nuit à 37° C en utilisant le protocole du Promega Ribomax T7 kit. Les matrices d'ADN ont été digérées avec ADNase et les l'ARN d'intérêt restant ont été lavés avec l'éthanol. Finalement les brins d'ARN ont été hybridés dans un bain d'eau à 90°C dont la température est descendue lentement pendant la nuit. Les produits ont été vérifiés sur gel d'agarose 1% pour apprécier leur concentration et leur taille.

Table IV: Séquences des amorces utilisées pour la fabrication des ARNdb contre Dia

Dia ARNi 1 (dsQ)	Primer F	GGGCGGGTTCGTTCTGCATTGTCTATGAGC
	Primer R	GGGCGGGTATCTTCTTCTCGTACTCCTCCG
Dia ARNi 2	Primer F	GGGCGGGTATGTCTCGTCACGAGAAAACG
	Primer R	GGGCGGTCCGCTCATAGACAATGCAGAA
Dia 5'UTR	Primer F	GGGCGGGTTCAACGCGCTGAGTAAATCGA
	Primer R	GGGCGGGTTGATATCTGTGTGCGCCTGCTC
Dia 3' UTR	Primer F	GGGCGGGTCCGCGTAGAAGTAATGGAAC
	Primer R	GGGCGGGTCTCTTGCTCTACTGAGTGCCTC

3.3 Microscopie

La microscopie en temps réel a été effectuée à la température ambiante avec un système Ultraview Vox spinning disc confocal (PerkinElmer), une unité de scan CSU-X1 (Yokogawa) et une caméra Orca-R2 CCD (Hamamatsu). Ce système été connecté à un microscope inversé Leica DMI6000B avec une platine motorisé piezo-electric (Applied Scientific Instrumentation). Le software Volocity, version 6.0, a été utilisé pour acquérir les images. Lorsque la prise des images était faite sur une longue période de temps ($> 4h$), on utilisait l'objective Plan Apo 40x (NA 0.85) avec un binning de 2x2. Pour des images avec haute résolution, on utilisait l'objective à l'huile Plan Apo 63x (NA 1.4) avec un binning 2x2 ou 1x1 selon le cas. Les cellules poussaient dans des plaques à 96 puits et 20 à 60 minutes avant l'acquisition, elles étaient transférées à une plaque de 8 puits avec un fond en verre (Labtek, Nunc).

Pour exprimer des protéines fluorescentes sous le promoteur de la metallothioneine (pMT), on induisait avec du $CuSO_4$ à une concentration de 250 μM 12 à 24h avant de commencer l'acquisition.

Pour induire la dépolymérisation des filaments d'actine, les cellules ont été traitées avec Latrunculine (LatA) à une concentration finale de 1 $\mu g/mL$ (Calbiochem). La drogue était ajoutée pendant l'acquisition.

3.4 Immunofluorescence

Les cellules qui avaient besoin d'un traitement (ARNdb ou LatA) ont été cultivées dans une plaque de 96 puits (Falcon) jusqu'au moins 1 h avant la fixation où les cellules étaient transférées à une plaque de 96 puits avec fond en verre (Whatman). Par la suite les cellules ont été fixées pendant 5 minute avec une solution de 4% formaldéhyde et 0.1% de glutaraldéhyde dans du PBS (phosphate-buffered saline). Le blocage et perméabilisation avec 0.1% de triton-X100 ont été faits avec une solution tampon de PTX et 5% de sérum de chèvre normal pendant une heure. Les cellules ont été incubées au moins 3 heures dans les anticorps primaires (Monoclonal anti- α -tubuline produit chez la souris; Sigma) à 4°C, lavées 4 à 5 fois dans une période de 30

minutes avec du tampon PTX. Les anticorps secondaires de chèvre Alexa-488 ou Alexa-546-conjugated anti-souris ou anti-lapin (1:500, Molecular Probes/ Invitrogen) selon le cas ont été ajoutés pendant une heure. Quand l'ADN ou les filaments d'actine devaient être marqués, on a utilisé Hoechst 33258 (1:500) et rhodamine-phalloïdine (1:500, Molecular Probes) au même temps que les anticorps secondaires. Finalement les cellules ont été lavées 4 à 5 fois pendant une période de 30 minutes avec du tampon PTX et elles ont été montées dans du Fluoromount-G (SouthernBiotech).

3.5 Immunobuvardage de type western

Des cellules de drosophile S2 non-transfectées ont été cultivées dans des plaques de 6 puits jusqu'à être confluentes. Les cellules ont été traitées avec un tampon de lyse (50mM Tris-HCl, 50mM NaCl et 1% triton X-100) avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche : Complete, protease inhibitor cocktail tablets). Les concentrations des protéines ont été quantifiées par la méthode de dosage de protéines Bradford (Biorad). Les lysats des cellules ont été dissouts dans un tampon Laemmli (20% glycérol, 200mM DTT, 4% SDS, 0,125M Tris-HCl, 0,05% bleu de bromophénol). Ces échantillons ont été chauffés pendant 5 minutes à 90°C. Les protéines ont migré dans un gel dénaturant 8% SDS-PAGE et par la suite ont été transférées dans une membrane de nitrocellulose Amersham Hybond ECL (GE Healthcare) à 0,06 A pendant la nuit. Par la suite, les membranes ont été immergées dans du rouge ponceau (0.1% Ponceau S (w/v), 5% acide acétique) pour évaluer la quantité de protéines transférées. Par la suite, les membranes ont été lavées avec TBST (50mM Tris base, 150 mM NaCl, 0,2 % Tween 20) et bloquées avec une solution de TBST et 5% lait (Carnation, Lait écrémé en poudre instantané) pendant une heure. L'anticorps de lapin contre Dia (provided by S. Wasserman, University of California, San Diego, La Jolla, CA; Castrillon and Wasserman, 1994)) a été dilué dans du TBST-1% lait à différentes concentrations allant de 1 :60 000 à 1 :1 000 et l'anticorps monoclonal de souris anti-Tubuline (Sigma) a été utilisé comme contrôle à une concentration de 1 :1000 pendant 4h ou pendant la nuit. Quatre lavages ont été faits avec du TBST-lait pendant une période de 30 minutes. Pour ce qui est des anticorps

secondaires, des anticorps anti-souris et anti-lapin (GE, ECL peroxidase antibody) ont été dilués dans du TBST-1% lait à une concentration de 1 :5000 pendant 1 h. Quatre lavages avec du TBST-lait ont été faits pendant une période de 30. Les membranes ont été incubées pendant 3 minutes avec un agent chemiluminescent (Bio-Rad, Clarity western ECL substrate). Finalement, les membranes ont été révélées sur des films (Fujifilm, Super RX) à différents temps d'exposition.

4 Résultats

4.1 Dia est essentielle pour la cytokinèse

Des ARNdb ont été générées pour observer les phénotypes des cellules suite à une réduction de l'expression de Dia pendant la cytokinèse dans des lignées cellulaires exprimant différentes composantes de la cytokinèse marquées à la fluorescence (Figure 18). Un ARNdb contre LacI, un gène inexistant chez la drosophile, est utilisé comme contrôle.

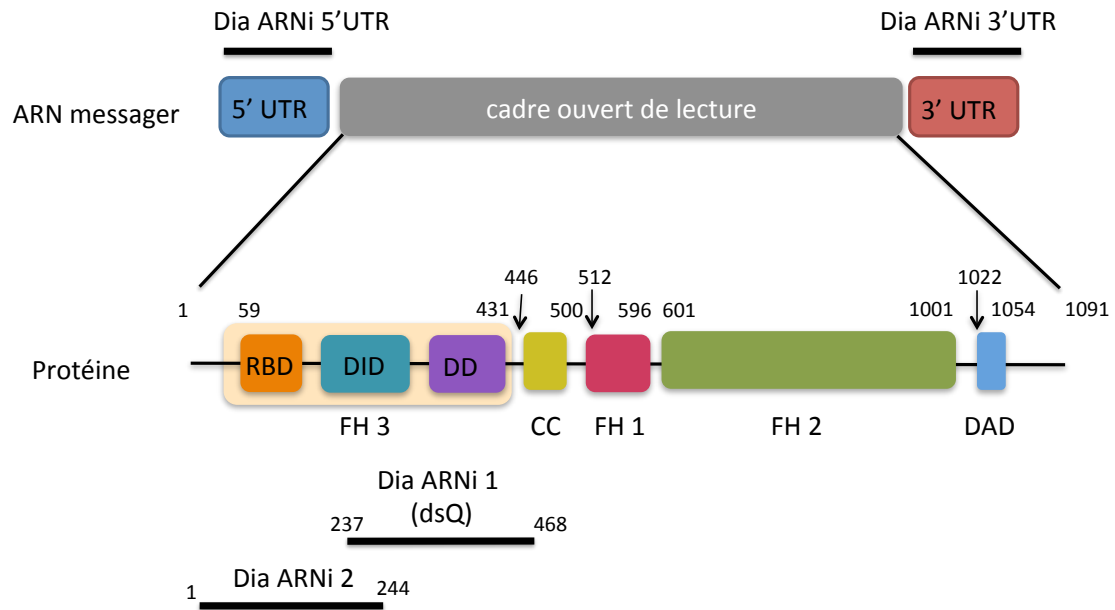


Figure 18: ARNdb générés contre les différentes régions de Dia. ARNdb contre les régions 3' et 5'UTR et deux ARNi ciblant les séquences entre les acides aminés 237 et 468 pour Dia ARNi 1 (dsQ) et entre 1 et 244 pour Dia ARNi 2. UTR : Untranslated region; RBD : Rho Binding Domain; DID : Diaphanous Inhibitory Domain, DD : Dimerization Domain; CC : Coil-coiled; FH : Formin Homology, DAD : Diaphanous Autoregulatory Domain.

Des immunobuvardages de type western des lysats des cellules S2 non transfectées ont été réalisés pour déterminer les niveaux de réduction de l'expression de Dia suite au traitement avec les différents ARNdb générés. Dia ARNi 1 et Dia ARNi2 visent des régions dans le cadre ouvert de lecture (ORF, « Open Reading Frame »). Contrairement, Dia ARNi 5' et 3' UTR seront utilisés pour diminuer l'expression de la protéine endogène dans des lignées cellulaires qui expriment Dia couplée à une protéine fluorescente.

Une dilution en série est réalisée avec des lysats des cellules traitées avec de l'ARNdb contrôle pour calculer le niveau de diminution d'expression de la protéine. Les lysats des cellules préalablement mises en culture avec les ARNdb Dia ARNi 1 ou Dia ARNi 2 pendant 72 h montrent une réduction de l'expression de Dia de plus de 80 % comparé au contrôle (Figure 19A). Deux bandes sont présentes dont la supérieure représente Dia et l'inférieure est le résultat des interactions non spécifiques avec l'anticorps puisque son intensité ne varie pas en fonction du traitement avec de l'ARNdb contre Dia. Une seule bande est observée suite à la dilution de 60 fois de l'anticorps contre Dia (Figure 19B). Également, les deux ARNdb contre les séquences 3'UTR et 5'UTR ciblant la protéine endogène diminuent son expression de 75 % comparé au contrôle après 72 h de traitement. Nous sommes alors certains que le traitement avec de l'ARNdb contre Dia mène à une réduction significative des niveaux d'expression de Dia.

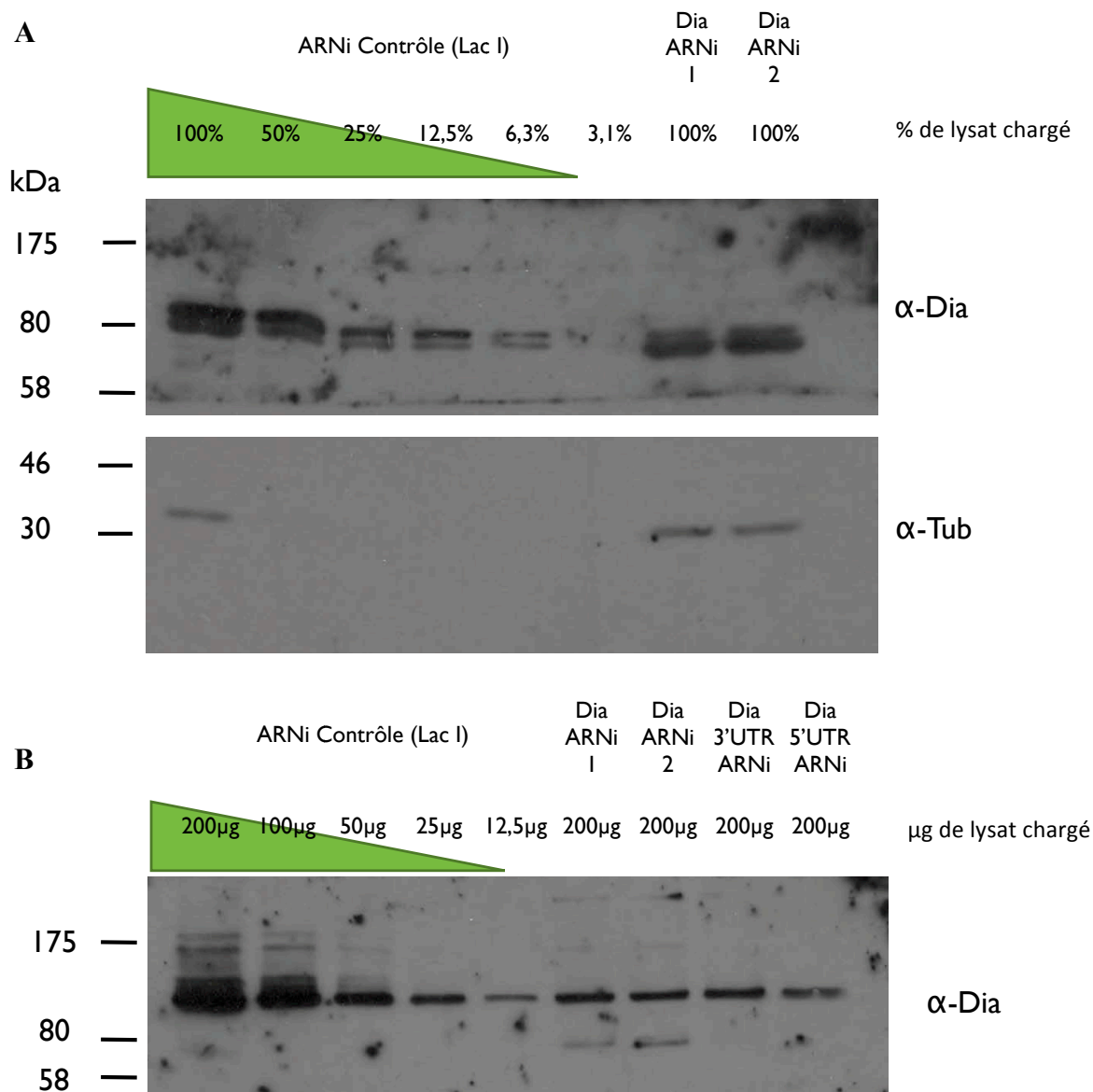


Figure 19: Réduction du niveau d'expression de Dia par traitement avec d'ARNdb. Immunobuvardages de type western représentatifs des lysats des cellules de drosophile S2 traitées avec de l'ARNdb contre LacI en contrôle et contre Dia pendant 72h. Lysats des cellules préalablement traitées avec Dia ARNi 1 et Dia ARNi 2 où la protéine a été détectée avec des anticorps contre Dia (dilution 1:5000) et contre Tubuline (dilution 1:1000) (A) ou cellules traitées avec Dia ARNi 1, Dia ARNi 2 Dia 3'UTR ARNi ou Dia5' UTR ARNi dont un anticorps contre Dia a été utilisé pour marquer la protéine (dilution 1:60 000) (B)

La Tubuline (Tub), un marqueur des microtubules qui est présente uniquement dans le cytoplasme, a été utilisée pour identifier les cellules binucléées qui ont échoué la cytokinèse. Les cellules marquées à la Tub-GFP ont été observées au microscope après 30 h de traitement avec les Dia ARNi 1 ou Dia ARNi 2. Elles sont suivies par microscopie en temps réel de l'anaphase jusqu'au moment où elles complètent la cytokinèse avec succès ou qu'elles l'échouent (Figure 20).

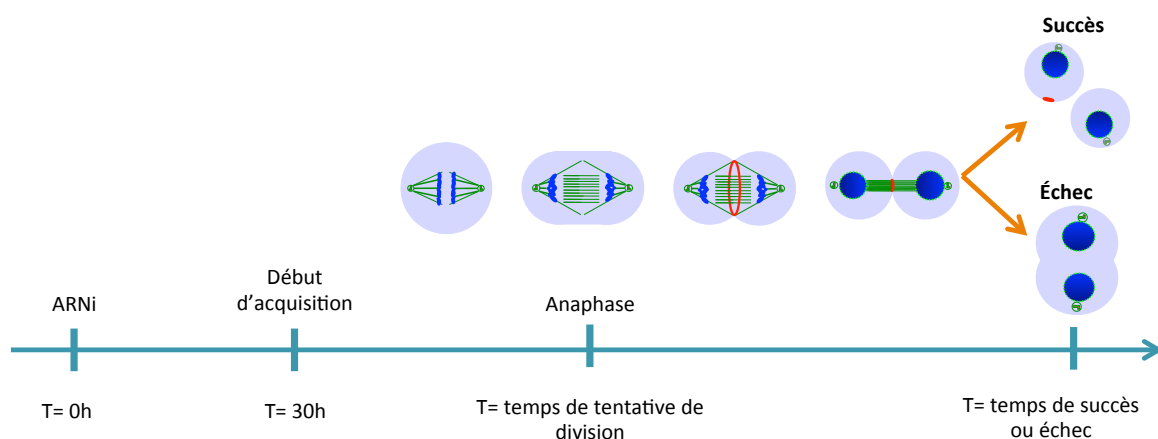


Figure 20: Représentation schématique de la procédure expérimentale. Les cellules sont mises en culture en présence de l'ARNbd et l'acquisition au microscope confocal débute 30 h après. Par la suite, les cellules sont suivies de l'anaphase jusqu'au moment où elles complètent la cytokinèse avec succès ou qu'elles l'échouent.

Le temps de tentative de division est la différence de temps entre l'ajout de l'ARNi et l'entrée en l'anaphase de chaque cellule. Les cellules dépourvues de Dia commencent à échouer la cytokinèse après 54 h du traitement, tandis que dans le contrôle elles continuent à se diviser. Après 72 h, la plupart des cellules échouent la cytokinèse et cette tendance se maintient pour les deux ARNdb contre Dia (Figure 21). Ces résultats confirment que Dia est essentielle pour la cytokinèse et que la déplétion de Dia a été efficace.

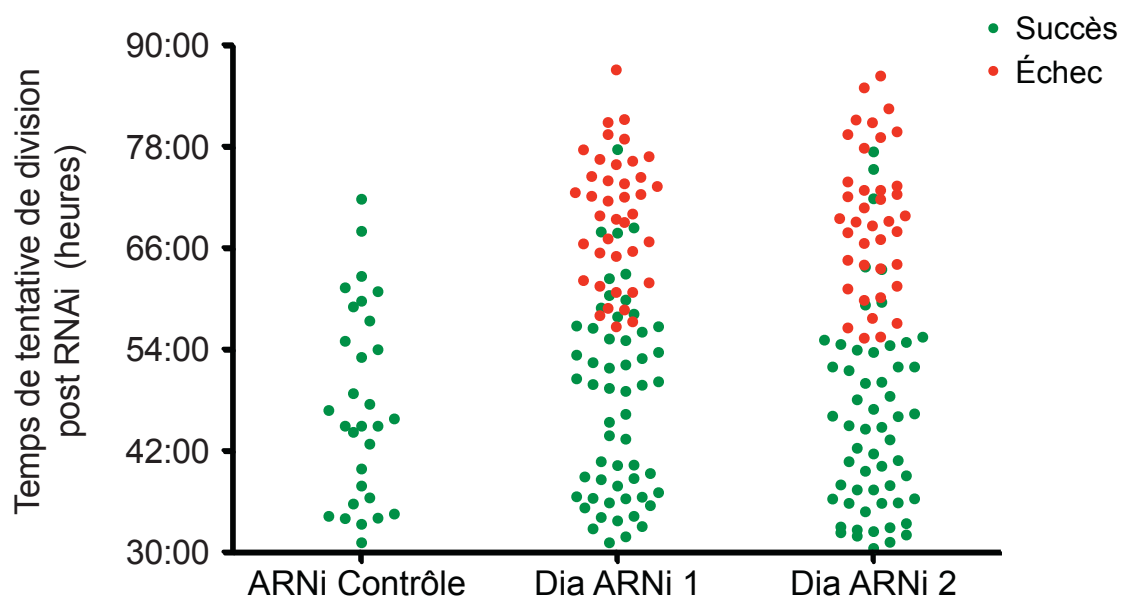


Figure 21: Détermination du temps nécessaire pour que les cellules échouent la cytokinèse en présence d'ARNdb contre Dia. Chaque point représente une cellule exprimant Tub-GFP située dans le temps suite au début du traitement avec les ARNdb contre Dia ou contrôle. Les cellules ont été traitées 30 h avant l'acquisition et ont été suivies jusqu'au moment où elles complètent la cytokinèse où l'échouent. $n > 30$.

Deux phénotypes différents sont observés à la suite de la déplétion de Dia par ARNdb dans les cellules exprimant Tub-GFP. Dans le premier phénotype, qui arrive à 70% des échecs, la contraction du fuseau mitotique ne semble pas se faire complètement et les cellules échouent la cytokinèse dans la première heure après l'anaphase. Dans deuxième phénotype qui caractérise le reste des cellules (30 %), la contraction du fuseau mitotique ressemble à celle du contrôle, mais la cellule échoue la cytokinèse (Figure 22). Les défauts de contraction suggèrent que Dia pourrait avoir un effet sur l'organisation de l'AC.

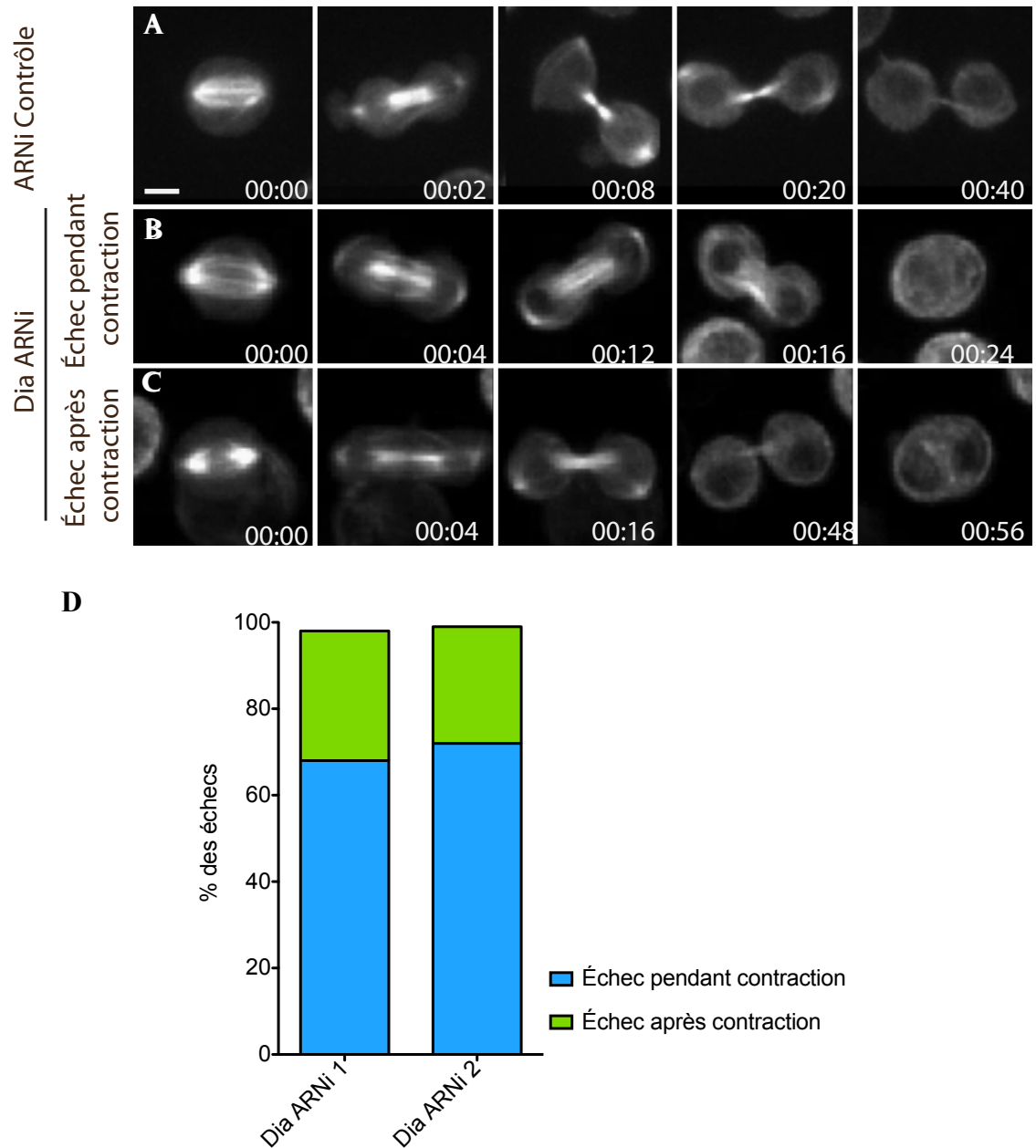


Figure 22: Les cellules dépourvues de Dia échouent la cytokinèse pendant ou après la contraction. Cellules exprimant tubuline GFP traitées pendant 72h avec de l'ARNdb contre LacI en contrôle (A) et avec de l'ARNi contre Dia. Objectif : 40 X; 5 μ m (B-C) Pourcentages des cellules qui présentent chacun des deux phénotypes pour les deux ARNi contre Dia utilisés. $n > 55$ (D).

Dans ce qui concerne le temps d'échec ou succès de la cytokinèse, il semble avoir un léger retard dans les cellules qui se séparent en présence d'ARNdb mais ceci n'est pas significatif. La plupart des échecs se produisent dans la première heure après l'anaphase (Figure 23).

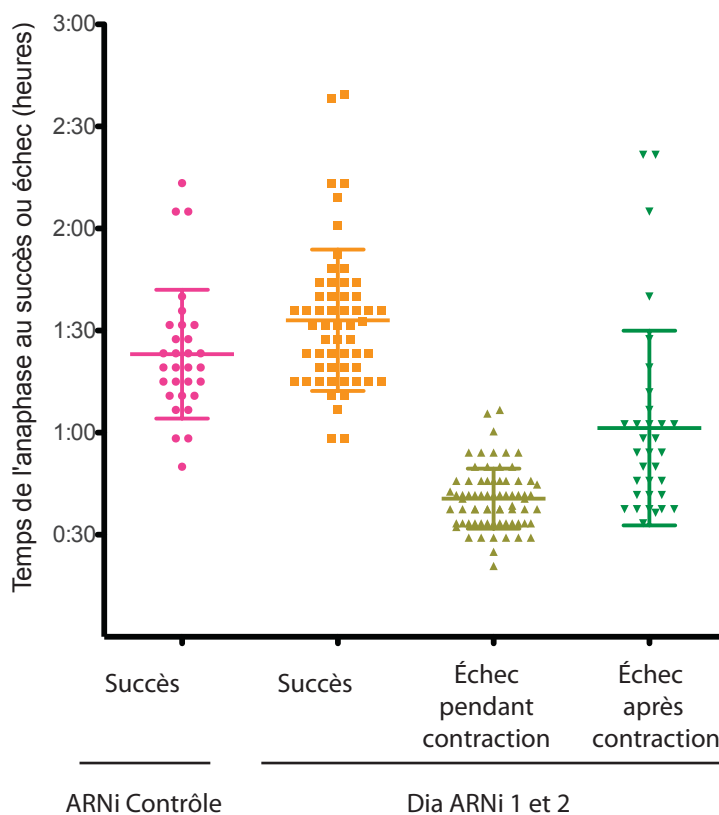


Figure 23: Temps de l'anaphase au succès ou échec de la cytokinèse suite au traitement avec ARNdb contrôle ou contre Dia. Chaque point représente une cellule marquée avec Tub-GFP dont le succès ou l'échec de la cytokinèse a été suivi dans le temps entre 30 heures et 90 heures de traitement d'ARNdb contrôle (LacI) et les deux ARNdb contre Dia. Moyennes et déviation standard; $n > 30$.

4.2 La déplétion de Dia affecte l'organisation et le comportement de l'AC

Les défauts de constriction pourraient s'expliquer par un rôle de Dia dans la formation de l'AC. L'utilisation d'une lignée cellulaire exprimant de façon constitutive Anilline-mCh et MRLCsqh-GFP (pour marquer la Myosine) permet de visualiser le comportement de l'AC lors de la diminution des niveaux d'expression de Dia. Dans le contrôle, l'Anilline et la Myosine sont toutes les deux recrutées à l'AC et restent à l'équateur pendant la maturation de l'AM. Lors de la déplétion de Dia, l'Anilline et la Myosine sont recrutées mais elles ne forment pas un anneau lisse comme dans le contrôle, elles sont plutôt recrutées en *puncta* (Figure 24).

Ces *puncta* sont capables d'initier la constriction de l'AC mais ne réussissent pas à former un AM fonctionnel puisque les cellules échouent la cytokinèse. La mesure du diamètre équatorial pendant la cytokinèse (Figure 25A) montre que les cellules contrôles contractent très rapidement, elles arrivent à moins de 20 % du diamètre initial dans les premières 10 minutes suite à l'anaphase. Par contre, le diamètre équatorial des cellules dépourvues de Dia diminue plus lentement et les mêmes phénotypes observés, comme dans le cas des cellules exprimant Tub-GFP: une population de cellules qui échouent pendant la contraction et une autre population qui échoue après la contraction. Dans les deux cas, les cellules ne se rendent pas au même niveau que le contrôle et la constriction est plus lente (Figure 25B).

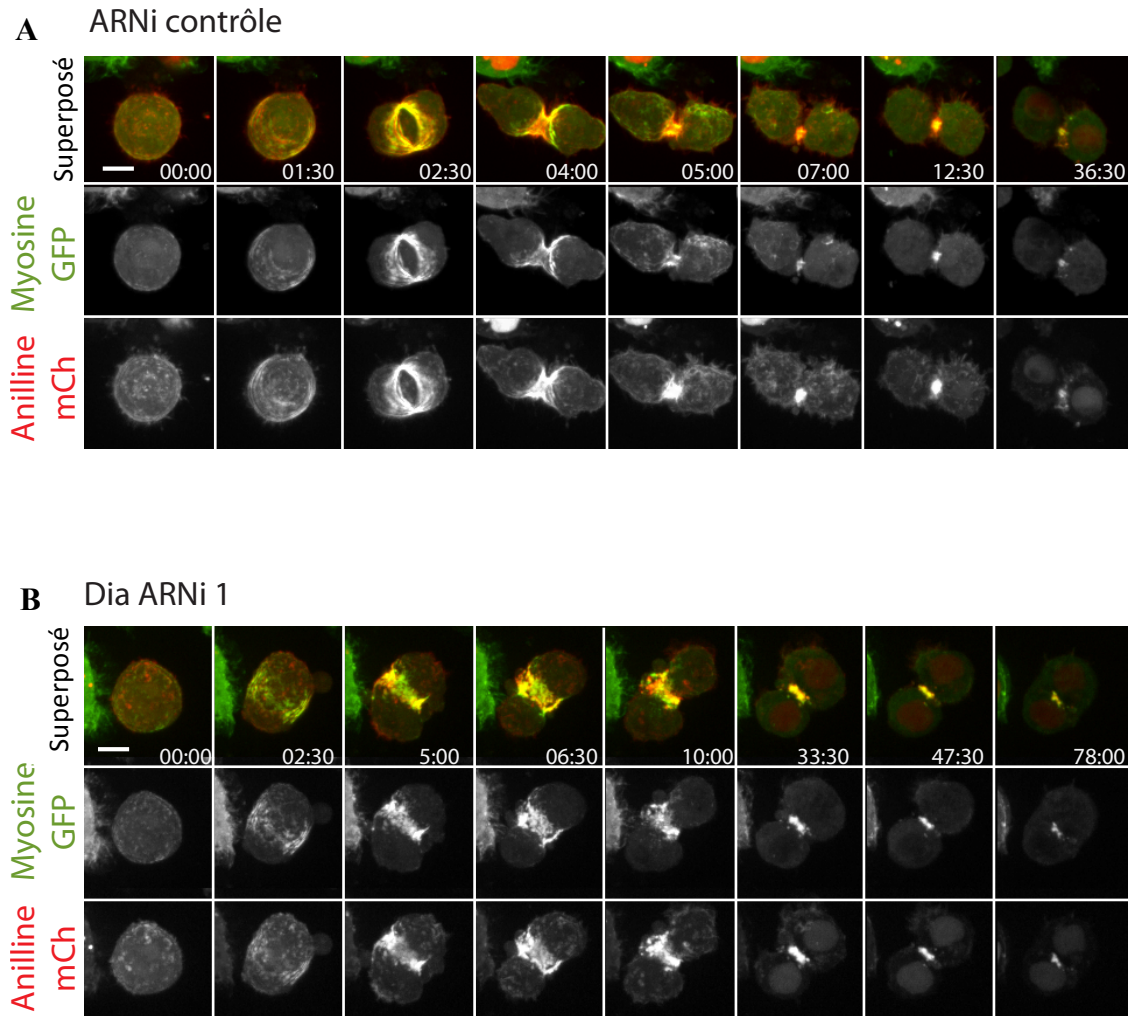


Figure 24: La diminution de Dia cause un recrutement désorganisé d’Anilline et Myosine. Cellules exprimant constitutivement Anilline-mCh et Myosine GFP après 75h de traitement avec de l’ARNdb contre LacI en contrôle (A) et l’ARNdb Dia ARNi 1 (B). 12 plans Z regroupés en fonction du point le plus intense de chaque canal. Objectif 63X; échelle 5 μ m.

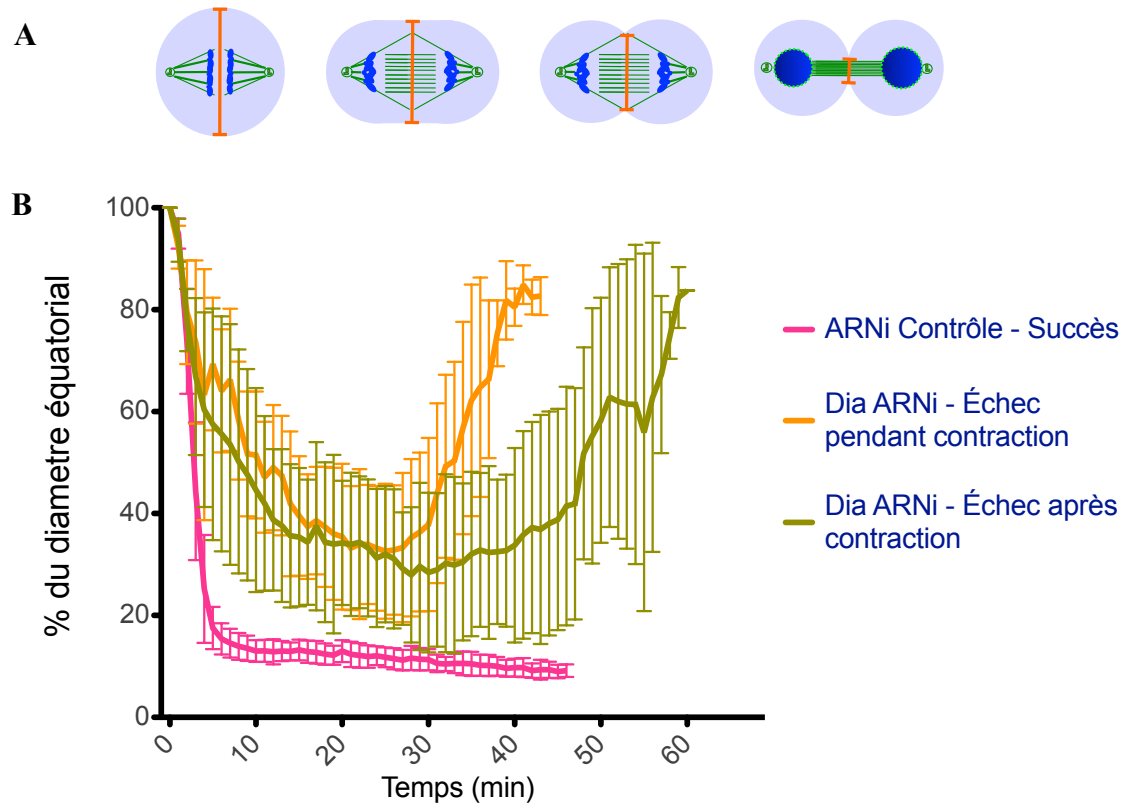


Figure 25 : Les cellules dépourvues de Dia démontrent une contraction équatoriale plus lente que le contrôle. Représentation schématiques des mesures du diamètre équatorial (A) Mesures du diamètre équatorial dans le temps à partir de la formation de l'AC dans des cellules exprimant Anilline-mCh et Myosine-GFP constitutivement traitées avec de l'ARNi contre LacI en contrôle ou contre Dia (Dia ARNi 1) pendant 75h. $n > 20$ (B).

Les kymographes de la Figure 26 montrent une augmentation des oscillations de l'AC dans les cellules traitées avec de l'ARNdb contre Dia. Dans la situation contrôle, une fois recrutées, l'Anilline et la Myosine restent en position équatoriale jusqu'à la formation de l'AM. Par contre, lorsque ces structures sont recrutées en absence de Dia, l'AC oscille.

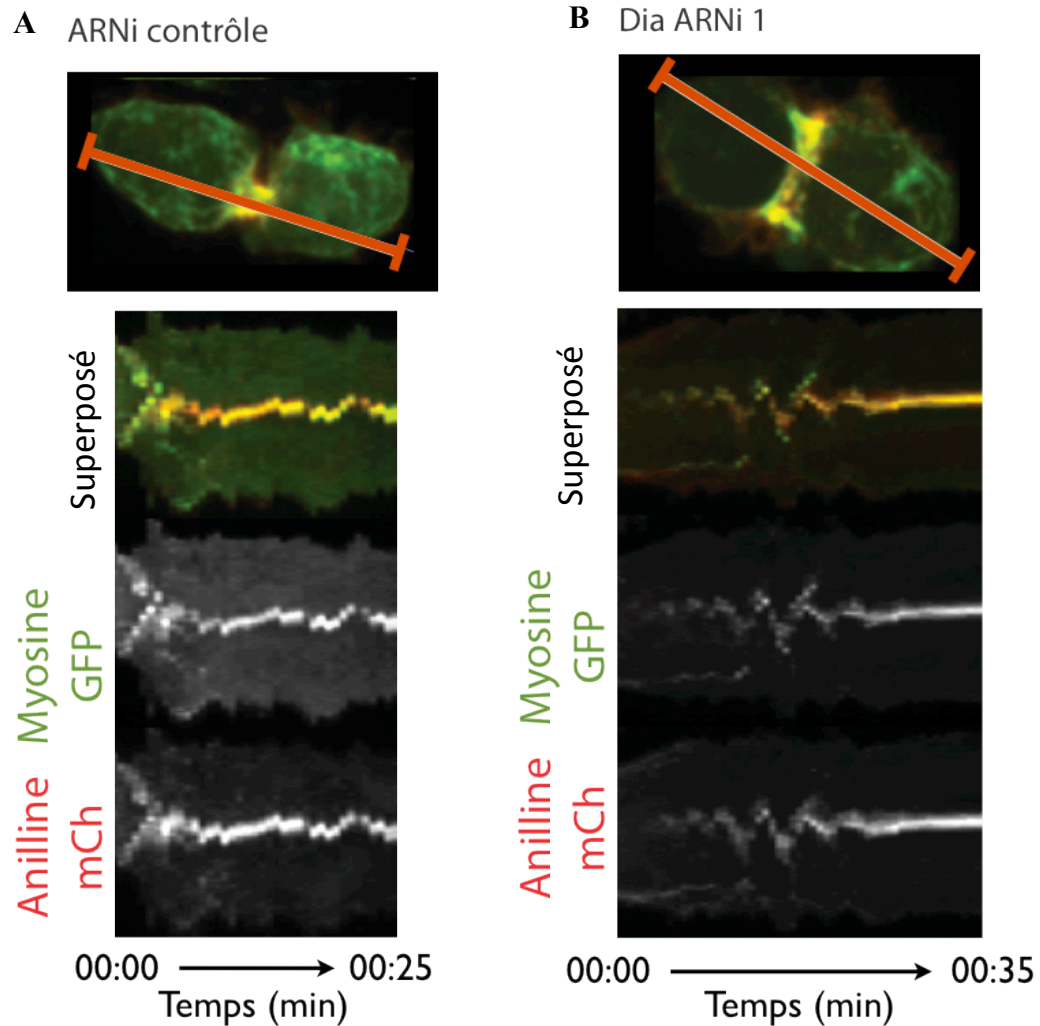


Figure 26: L'AC des cellules dépourvues de Dia oscille. Kymographes illustrant la distribution de l'Anilline et de la Myosine en fonction du temps dans des cellules exprimant Anilline-mCh et Myosine-GFP traitées pendant 75h avec de l'ARNdb contreLacI en contrôle (A) ou contre Dia (B).

Finalement, les *puncta* d'Anilline et de Myosine se trouvent seulement dans la partie corticale de l'équateur. De plus, bien que la majorité des *puncta* contiennent de l'Anilline et de la Myosine, leur colocalisation n'est pas parfaite (Figure 27). Donc, même si les composantes de l'AC sont bien recrutés au cortex équatorial leur organisation est perturbée suite à une déplétion de Dia.

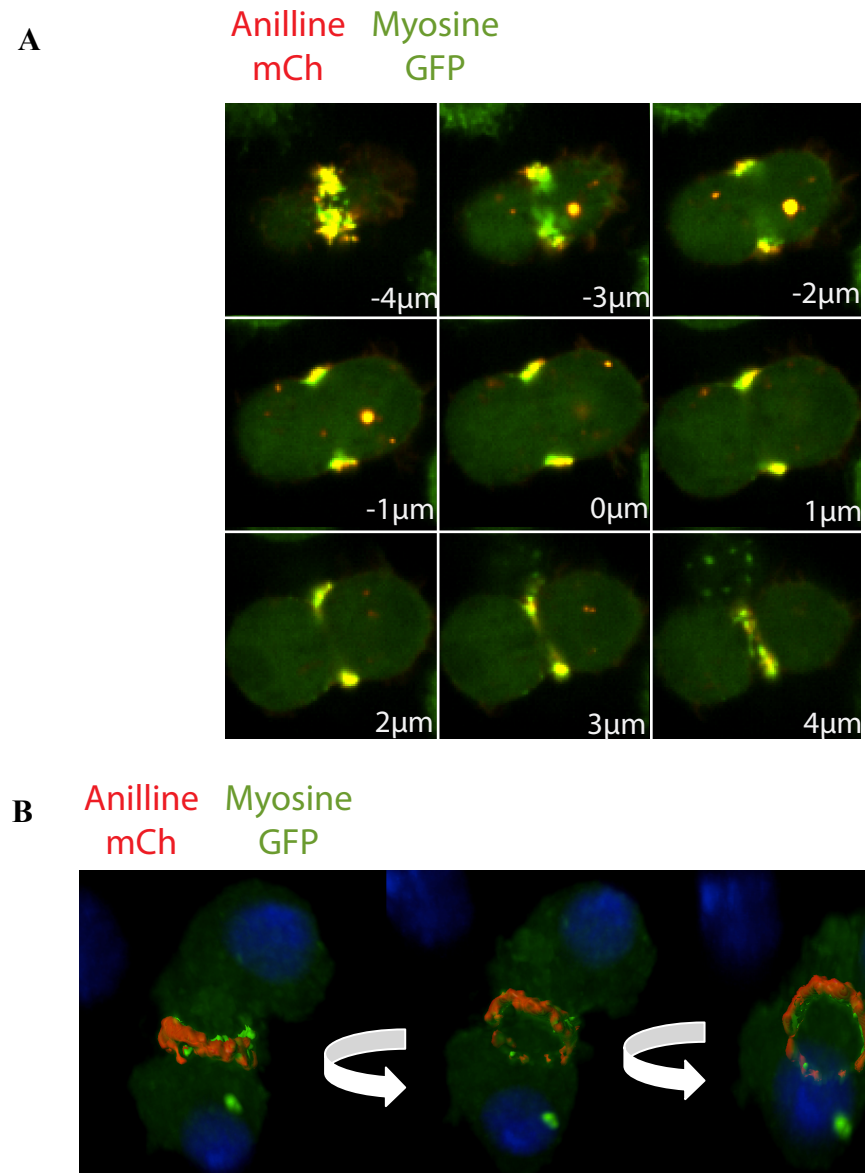


Figure 27: Les *puncta* trouvés dans des cellules dépourvues de Dia sont parfaitement corticaux. Différents plans dans l'axe des Z d'une cellule exprimant Anilline-mCh et Myosine-GFP (A). Rotation de la reconstruction 3D d'une cellule exprimant Anilline-mCh et Myosine GFP fixée au formaldéhyde 4% (B). Objectif 63X; échelle 5μm.

Ensemble, ces résultats suggèrent que Dia est responsable de l'organisation de l'AC et permet la formation d'un AM fonctionnel (Figure 28).

Cellules dépourvues de Dia

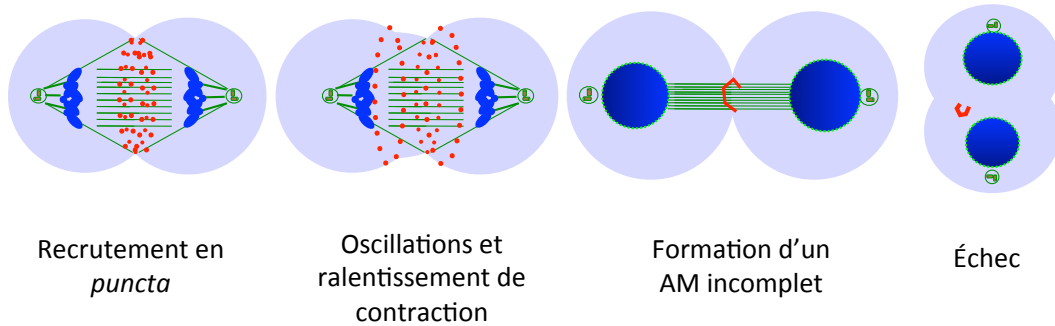
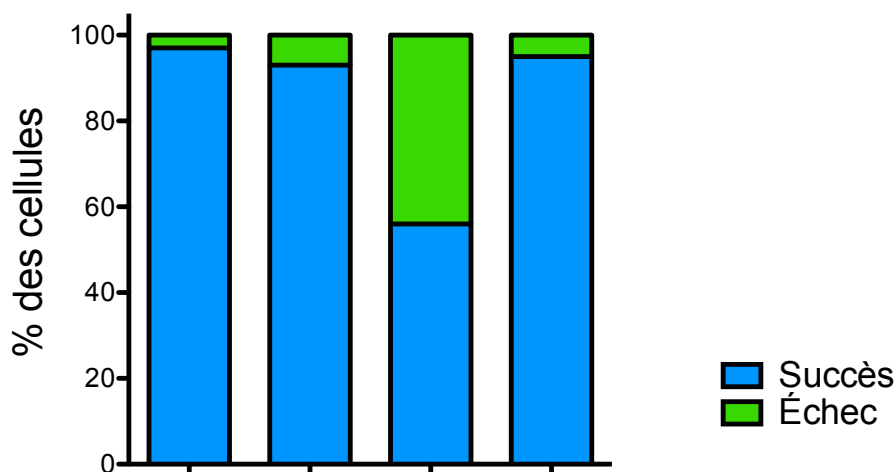


Figure 28: Modèle illustrant les phénotypes trouvés dans des cellules dépourvues de Dia. Les cellules dépourvues de Dia recrutent les composants de l'AC en *puncta*, elles oscillent avec une contraction ralentie et forment un AM non fonctionnel puisqu'elles échouent la cytokinèse.

4.3 Localisation de Dia pendant la cytokinèse

4.3.1 Dia localise à l'AC et à l'AM prématuré

Dia est une protéine candidate en tant qu'organisateur de l'AC et de l'AM. Alors, la localisation de Dia pendant la cytokinèse a été étudiée en utilisant une construction de Dia couplée à m-Ch. Les cellules traitées avec des ARNdb contre les régions 3'UTR ou 5' UTR et exprimant Dia m-Ch ont échoué moins souvent la cytokinèse que celles non-induites, aussi traitées avec les mêmes ARNdb (Figure 29). Donc, la construction de Dia-mCh est fonctionnelle.



ARNi contrôle (LacI)	+	+	-	-
Dia ARNi 3' ou 5' UTR	-	-	+	+
Induction (CuSO ₄)	-	+	-	+

Figure 29 : Dia mCh est capable de rétablir la cytokinèse suite à une diminution de Dia endogène. Pourcentage des cellules exprimant Dia mCh inductible qui complètent avec succès la cytokinèse ou qui l'échouent en présence de l'ARNdb contre LacI comme contrôle ou contre la région 3' ou 5' UTR de Dia. n > 60.

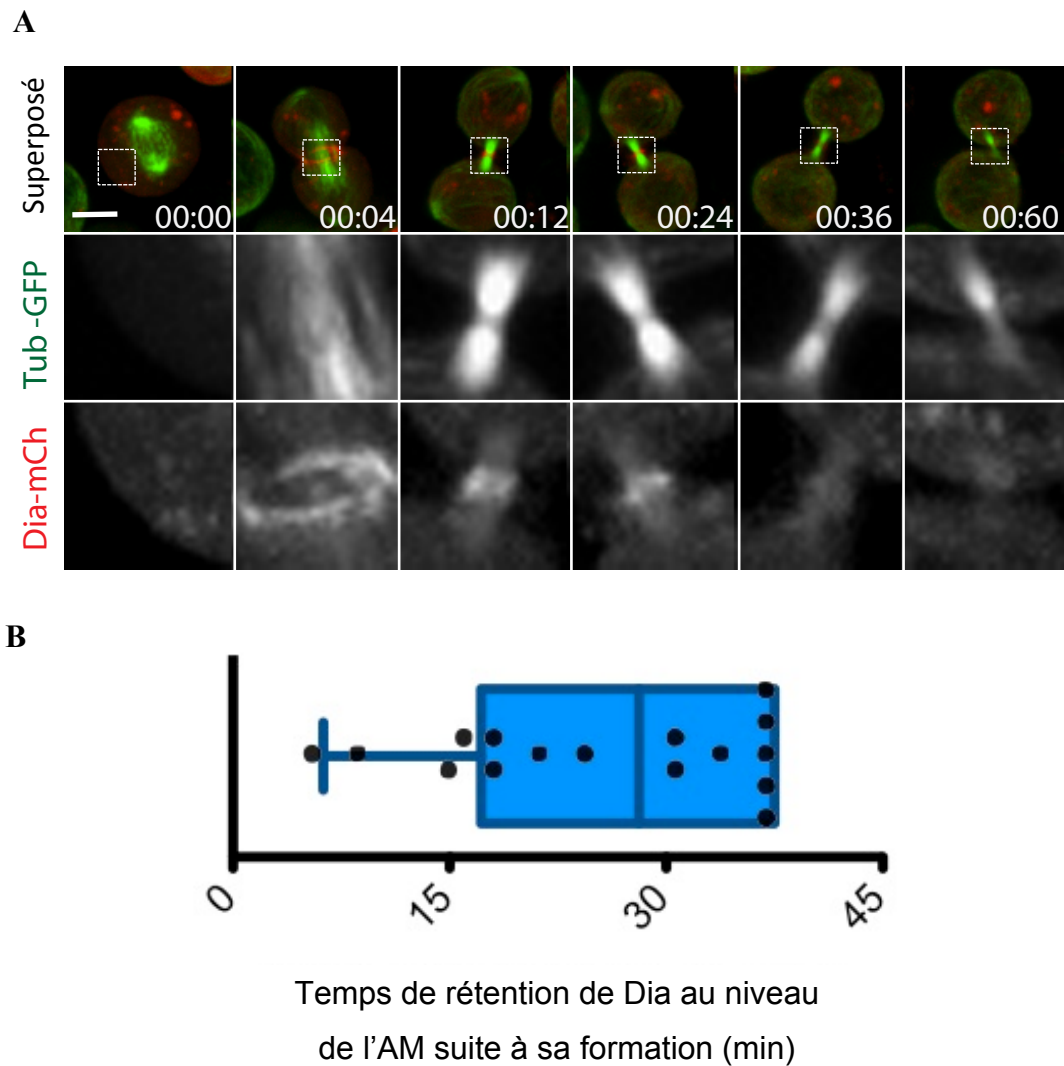


Figure 30: Dia se localise à l'AC et à l'AM prématuré. Cellules exprimant Dia-mCh et Tub-GFP après 24h d'induction avec CuSO_4 . Magnification (4X) des sections encadrées. Objectif 63X; échelle $5\mu\text{m}$ (A). Box plot du temps de rétention de Dia au niveau de l'AM suite à sa formation, chaque point représente une cellule. $n=16$ (B).

Dans une lignée cellulaire exprimant Dia m-Ch et Anilline-GFP, Dia colocalise avec l'Anilline mais commence à quitter l'AM quand l'Anilline est encore à l'AM (Figure 31A). Le même comportement est observé dans une lignée cellulaire exprimant

Dia-mCh et Myosine-GFP (Figure 31B). Ceci confirme que Dia quitte l'AM suite à sa formation.

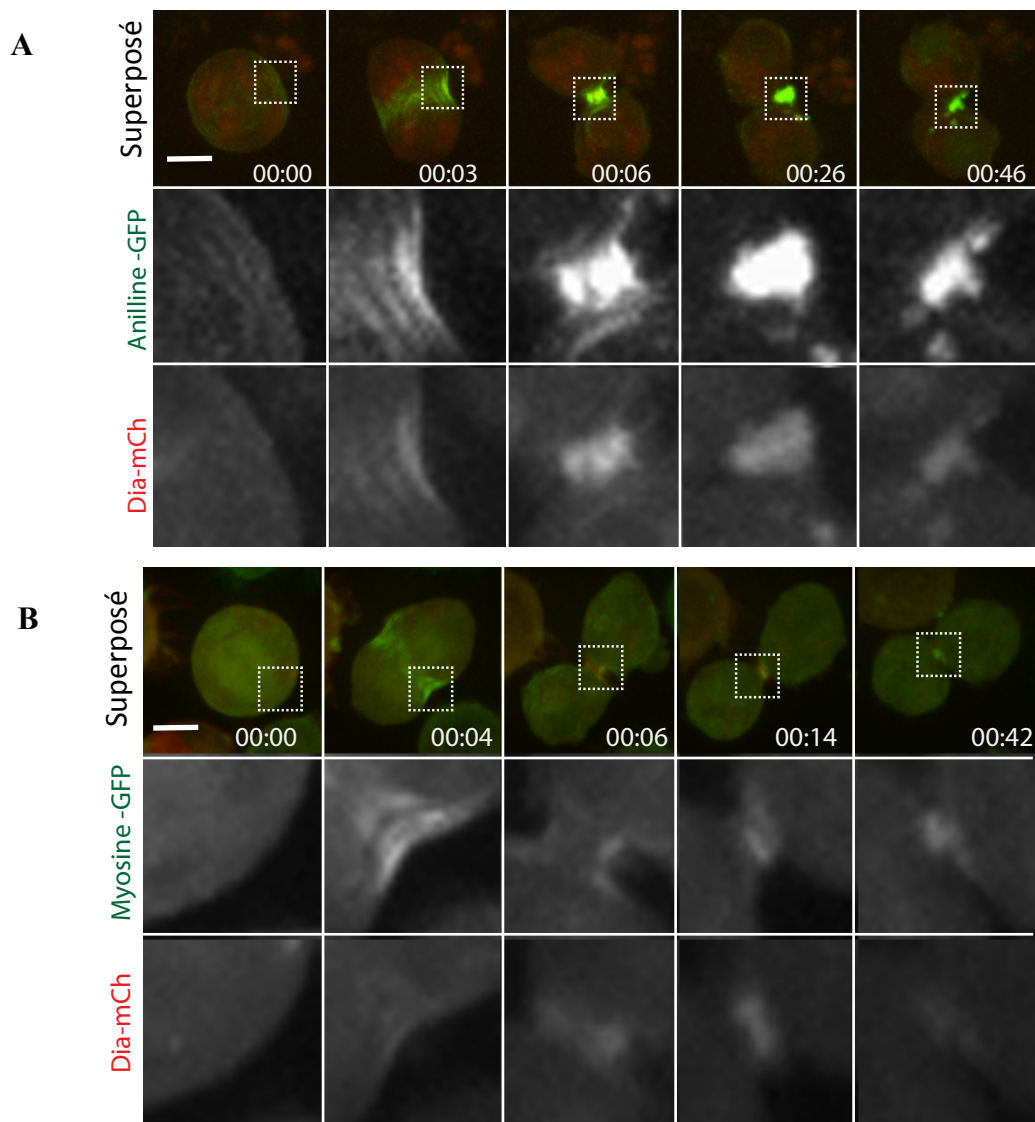


Figure 31: Dia colocalise avec l'Anilline et la Myosine à l'AC et à l'AM prématuré. Cellules exprimant Dia mCh et Anilline-GFP (A) ou Myosine-GFP (B) après 24h d'induction avec CuSO_4 . Magnification (4X) des sections encadrées. Objectif 63X; échelle $5\mu\text{m}$.

Sachant que Dia co-localise avec l'Anilline et qu'elle est capable de lier l'actine, nous voulions savoir si Dia se trouve dans les structures formées lors du traitement avec LatA (GH2008). Effectivement, Dia fait aussi partie de ces structures mais ne colocalise pas parfaitement avec l'Anilline. En plus, le signal de Dia diminue pendant que le signal d'Anilline reste très intense (Figure 32). Donc, l'actine n'est pas nécessaire pour la rétention de Dia à l'équateur ni pour sa perte à l'AM.

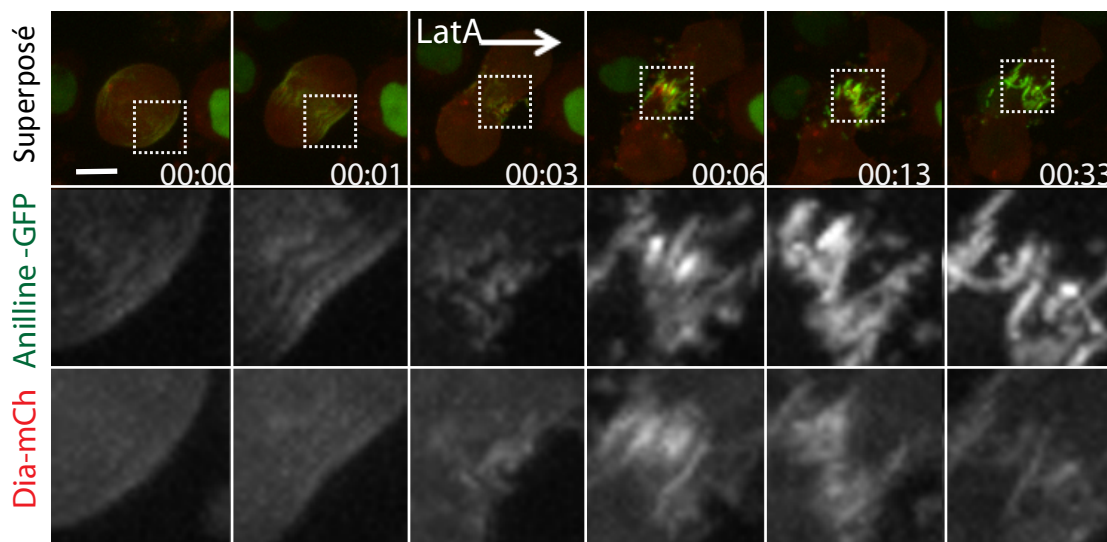


Figure 32: Dia se localise de façon transitoire aux conglomerats d'Anilline suite au traitement avec LatA. Cellules marquées avec Anilline-GFP et Dia m-Ch traitées avec LatA (1 μ g/mL) après 3 minutes du début d'anaphase. 24 h d'induction avec CuSO₄. Grossissement (4X) des sections encadrées. Objectif 63X; échelle 5 μ m

Dia est aussi recrutée même en absence d'actine, suite au traitement avec LatA. Les agrégats de Dia sont complètement dépourvus d'actine, alors Dia est capable d'être recrutée indépendamment de l'actine dynamique (Figure 33).

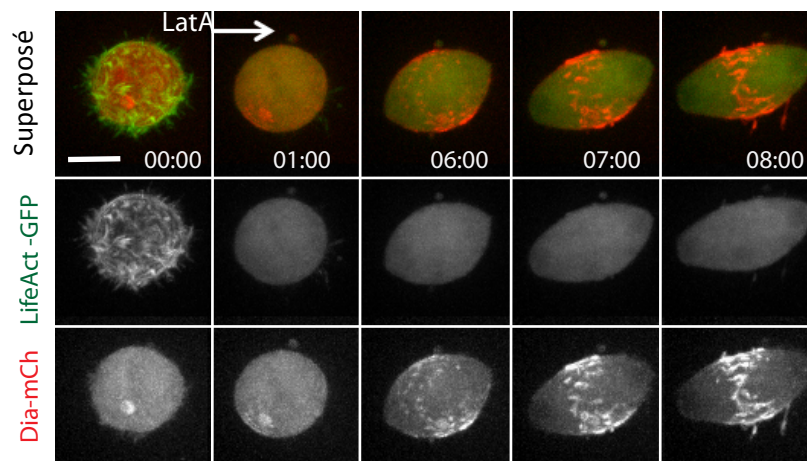


Figure 33: Dia est recrutée en absence d'actine. Cellule exprimant Dia-mCh et LifeAct-GFP traitée en métaphase avec LatA ($1\mu\text{g/mL}$) après 18 heures d'induction avec CuSO_4 . Objectif 63X; échelle 5 μm .

4.3.2 Les tronctions de Dia ne localisent pas à l'AC ni à l'AM

Sachant que Dia est recrutée à l'AC indépendamment de l'actine, nous voulions savoir quelle partie de Dia est responsable de ce recrutement. Deux tronctions de Dia ont été générées: une qui comporte le domaine de liaison au GTP et l'autre qui contient les domaines FH1, FH2 et le DAD (Figure 34).

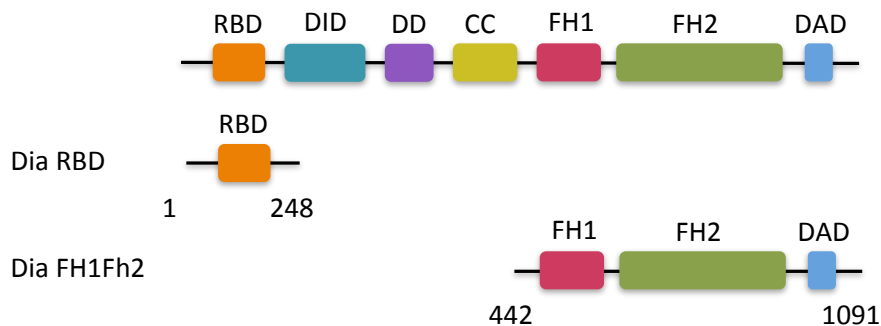


Figure 34: Représentation schématique des tronctions de Dia. Dia RBD comporte les premières 248 acides aminées et Dia FH1FH2 comporte les dernières 649 acides aminées. RBD : Rho binding domain; FH1FH2 : Formin homology domain 1 et 2; DID : Diaphanous Inhibitory Domain, DD : Dimerization Domain; CC : Coil-coiled; DAD : Diaphanous Autoregulatory Domain.

Dia RBD ne localise pas au niveau de l'AC ni au niveau de l'AM (Figure 35A). Alors, la région RBD n'est pas suffisante pour expliquer la localisation de Dia dans l'AC. Également, le domaine FH1FH2 n'est pas capable de localiser l'AC (Figure 35B). Dia a besoin de plus que le RBD et le FH1FH2 pour localiser puisqu'indépendamment ces deux domaines ne suffisent pas à recruter Dia à l'AC de façon appropriée.

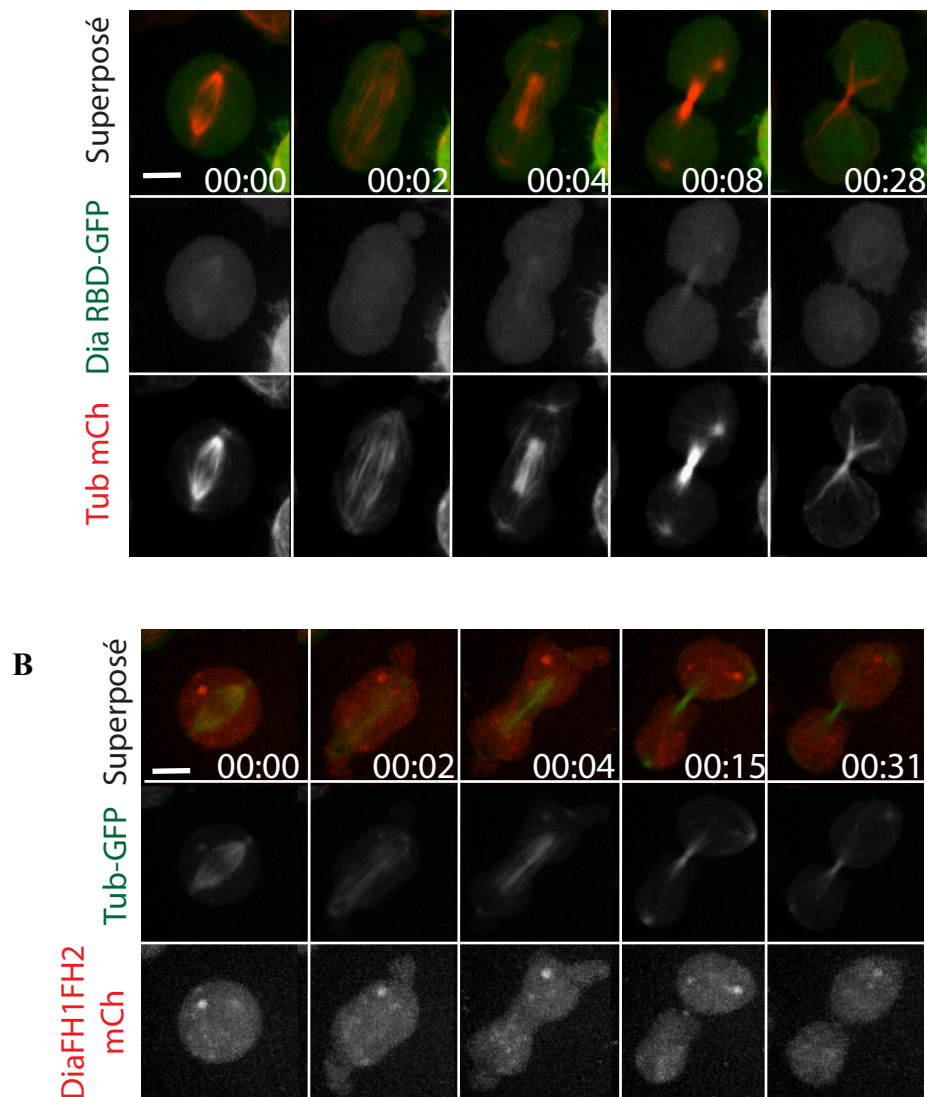


Figure 35: Dia RBD et Dia FH1FH2 ne localisent pas à l'AC ni à l'AM. Cellules exprimant Dia RBD-GFP et Tub-mCh après 20 h d'induction avec CuSO_4 (A). Cellules exprimant Dia FH1FH2 m-Ch et Tub GFP après 18h d'induction avec CuSO_4 (B). Objectif 63X; échelle $5\mu\text{m}$.

4.4 Localisation de l'actine pendant la cytokinèse

4.4.1 L'intensité d'actine augmente dans l'AC

Étant donné que Dia est un nucléateur d'actine essentiel pour la cytokinèse qui est recruté à l'AC et à l'AM, il est important d'étudier le comportement de l'actine pendant la cytokinèse. LifeAct, une sonde qui marque les filaments d'actine, montre que l'actine se localise à l'AC et à l'AM (Figure 36).

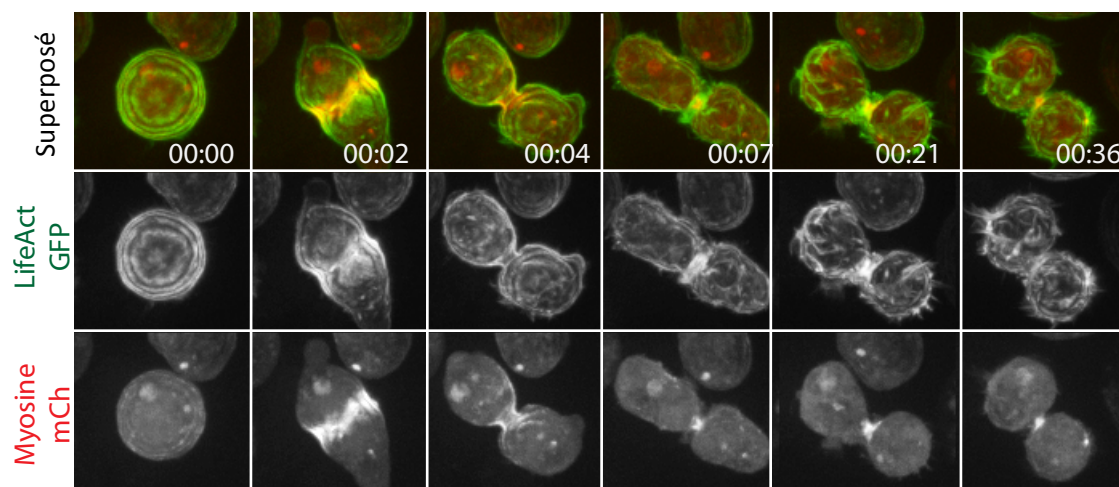


Figure 36: L'actine est enrichie à l'AC et à l'état précoce de l'AM. Cellules exprimant LifeAct-GFP, Myosine-mCh après 5 jours de traitement avec ARNi contrôle (LacI) et 24h d'induction avec CuSO_4 . Objectif 63X; échelle 5 μm

Le suivi de l'intensité de LifeAct dans le temps au niveau de l'AM montre que suite à la formation de l'AM il y a une augmentation soudaine de la quantité d'actine suivie par une forte diminution (Figure 37 et Annexe A). L'enrichissement de l'actine au niveau de l'AM diminue environ 30 minutes après sa formation, soit le moment auquel nous observons Dia quitter l'AM.

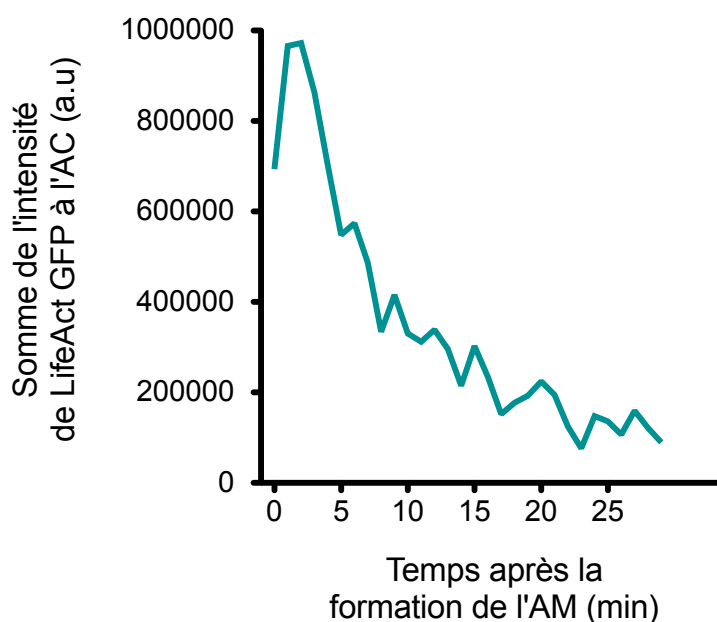


Figure 37: La somme de l'intensité du signal de l'actine augmente suite à la formation de l'AM et ensuite diminue soudainement. Mesure de la somme de l'intensité du signal de l'actine dans une cellule représentative. Voir annexe A pour plus des cellules.

4.4.2 L'actine n'est plus enrichie à l'AC en absence de Dia

Lorsque les niveaux d'expression de Dia sont diminués dans une lignée cellulaire exprimant LifeAct GFP et Myosine m-Ch, les niveaux d'actine dans la zone équatoriale diminuent considérablement comparés au contrôle (Figure 38).

En effet, un plan cofocal montre que l'actine et la Myosine colocalisent très bien dans le contrôle, tandis que lors de la diminution de l'expression de Dia il n'y a pas d'enrichissement d'actine dans les structures marquées par la Myosine (Figure 39).

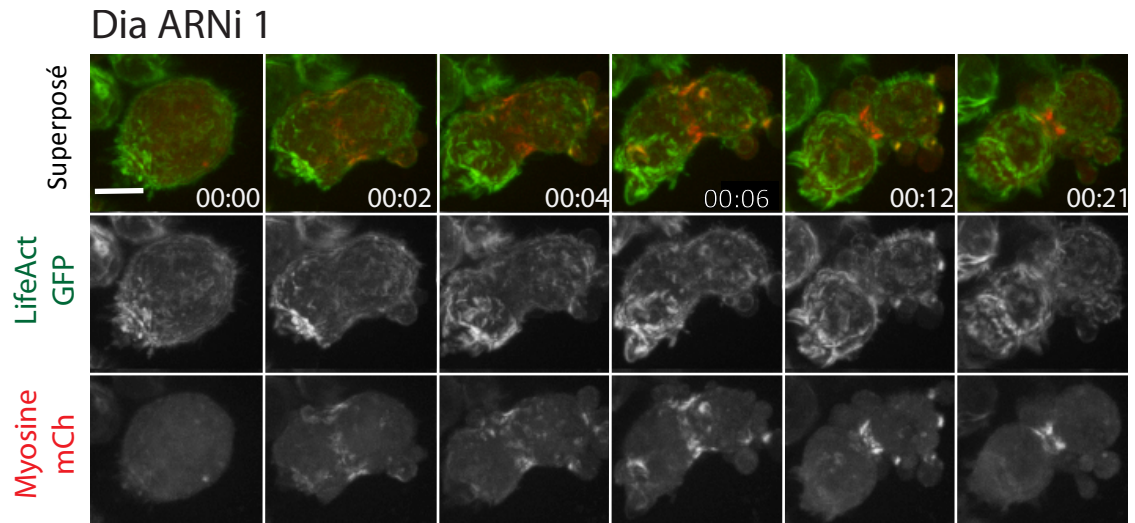


Figure 38: L'actine n'est pas enrichie à l'AC ni à l'AM en absence de Dia. Cellules exprimant LifeAct-GFP, Myosine mCh après 5 jours de traitement avec ARNi contre Dia et 24h d'induction avec CuSO_4 . Objectif 63X; échelle 5 μm .

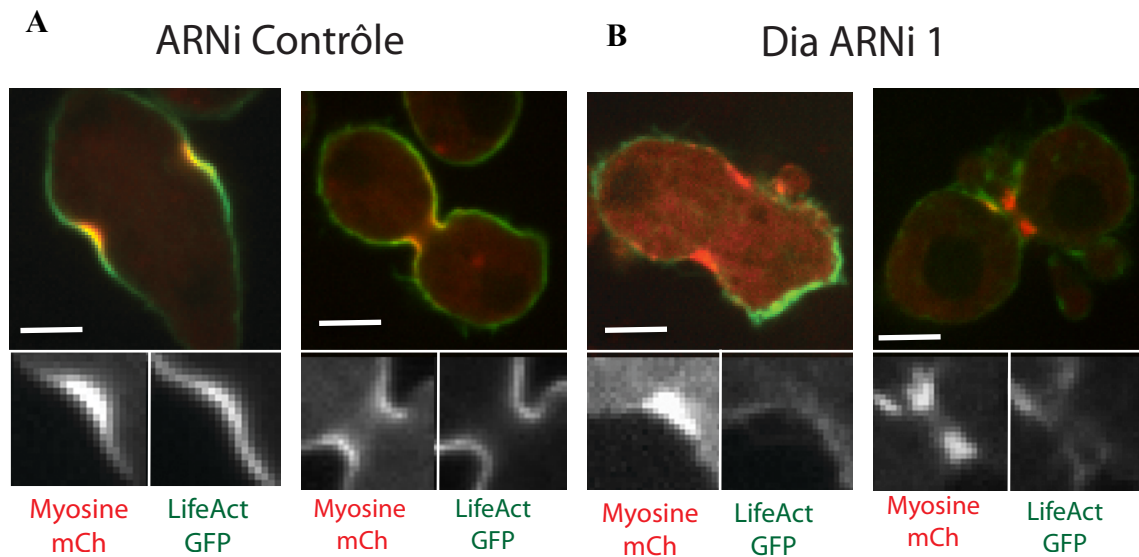


Figure 39: L'actine n'est pas enrichie à l'AC ni à l'AM après la déplétion de Dia par ARNbd. Cellules exprimant LifeAct-GFP, Myosine-mCh après 5 jours de traitement avec de l'ARNbd contre LacI en contrôle et contre Dia (Dia ARNi 1) et 24h d'induction avec du CuSO_4 . Objectif 63X, échelle 5 μm .

Nous avons quantifié cette diminution en mesurant la quantité d'actine dans le cortex de la cellule. Dans un plan confocale au milieu de la cellule, le profil du contour de la cellule au cortex permet de mesurer le ratio de la moyenne de l'intensité du signal de l'actine ou l'Anilline entre l'équateur et les pôles (Figure 40A). Ces calculs montrent que dans le contrôle il y a au moins le double d'actine à l'équateur, tandis qu'en présence de l'ARNdb contre Dia le ratio diminue à 1 (Figure 40B). Également, il y a une légère diminution de la quantité d'Anilline dans les cellules traitées avec de l'ARNdb contre Dia mais ceci n'est pas significatif. Ces résultats confirment une diminution de la quantité d'actine à l'équateur en absence de Dia.

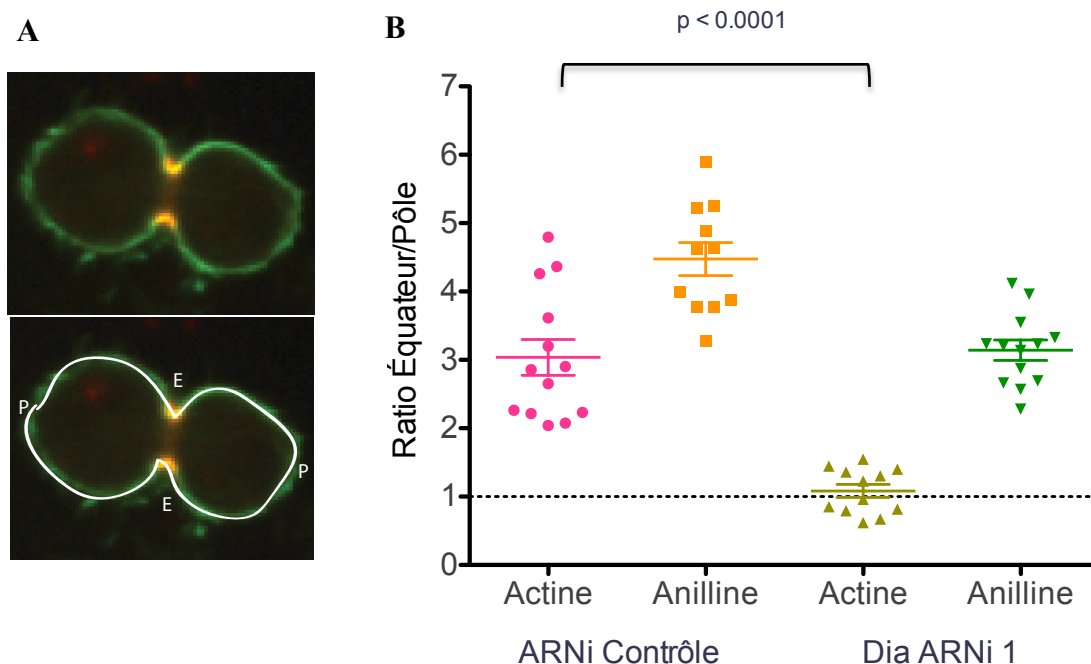


Figure 40: Le ratio de la moyenne de l'intensité d'actine à l'équateur sur les pôles dans les cellules diminue trois fois en absence de Dia. Calcul des moyennes des intensités le long de l'axe longitudinale des cellules exprimant LifeAct-GFP, Anilline mCh après 5 jours de traitement avec de l'ARNi contre LacI en contrôle et contre Dia (Dia ARNi 1) après 24h d'induction avec du CuSO₄. Chaque point représente une cellule. P : Pôle; E : équateur.

Ces résultats suggèrent que Dia est responsable en grande partie de la polymérisation des filaments d'actine au niveau de l'AC. Alors, une proposition plausible serait que Dia est recrutée à l'AC où elle polymérise les filaments d'actine jusqu'à ce que l'AM n'ait plus besoin de l'actine et Dia quitte l'AM ce qui correspond à la diminution de la quantité d'actine à l'équateur (Figure 41).

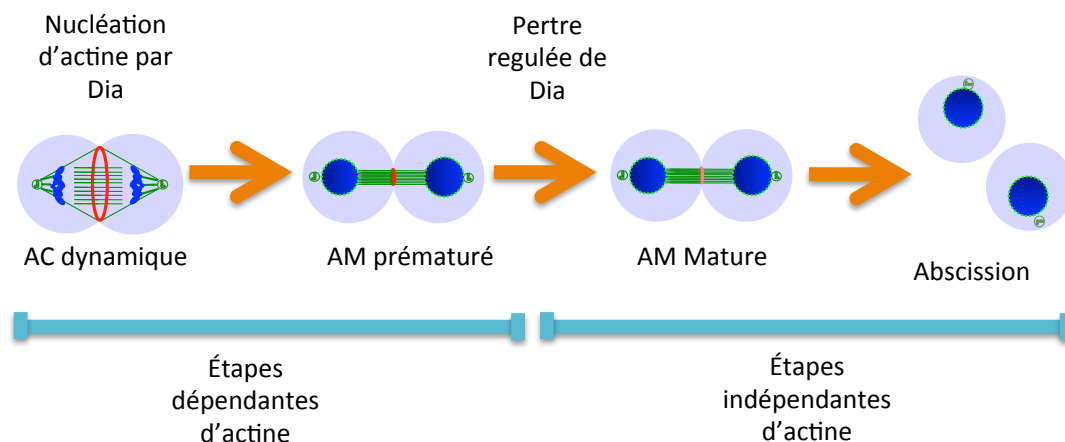
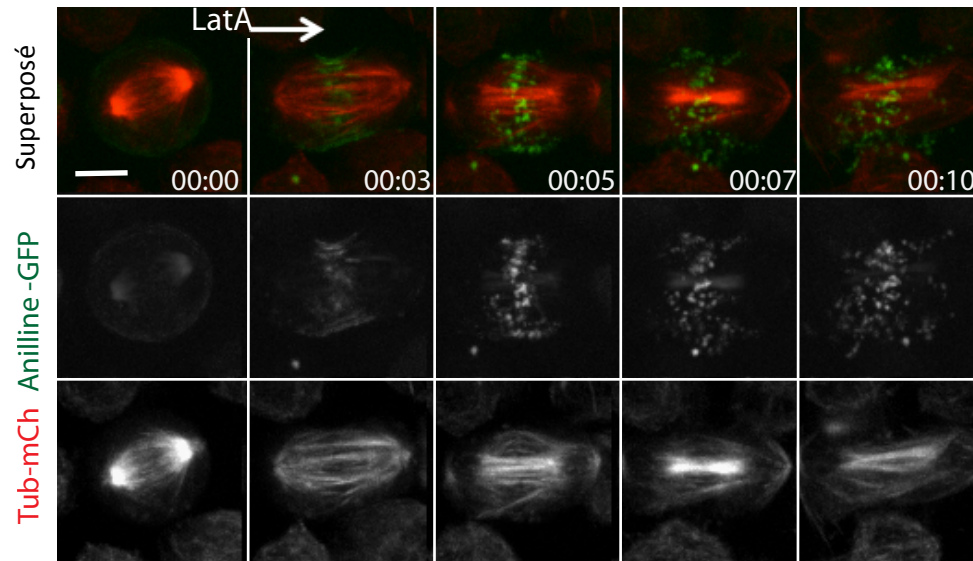


Figure 41: Représentation schématique du modèle de transition de l'AC à l'AM et sa maturation. Lors de la formation de l'AC Dia polymérise les filaments d'Actine ce qui rend l'AC dynamique, mais plus tard elle quitte l'AM afin de permettre la transition vers l'étape moins dynamique et indépendante de l'actine.

4.4.3 Le traitement avec LatA écarte les *puncta* issues d'une déplétion de Dia

L'Anilline est essentielle pour la formation des conglomerats observés lors du traitement des cellules avec LatA (Hickson and O'Farrell 2008). Pour tester le rôle de Dia dans ces événements dépendants de l'Anilline, nous avons traité des cellules avec de l'ARNdb contre Dia et avec de la LatA. Comme décrit plus haut et en accordance avec ce qu'on observe dans la littérature, des cellules contrôles traitées avec de la LatA recrutent l'Anilline en agrégats à l'équateur (Figure 42A). De même façon, la déplétion de Dia provoque le recrutement de l'Anilline en *puncta* (Figure 42B).

A ARNi Contrôle + LatA



B Dia ARNi

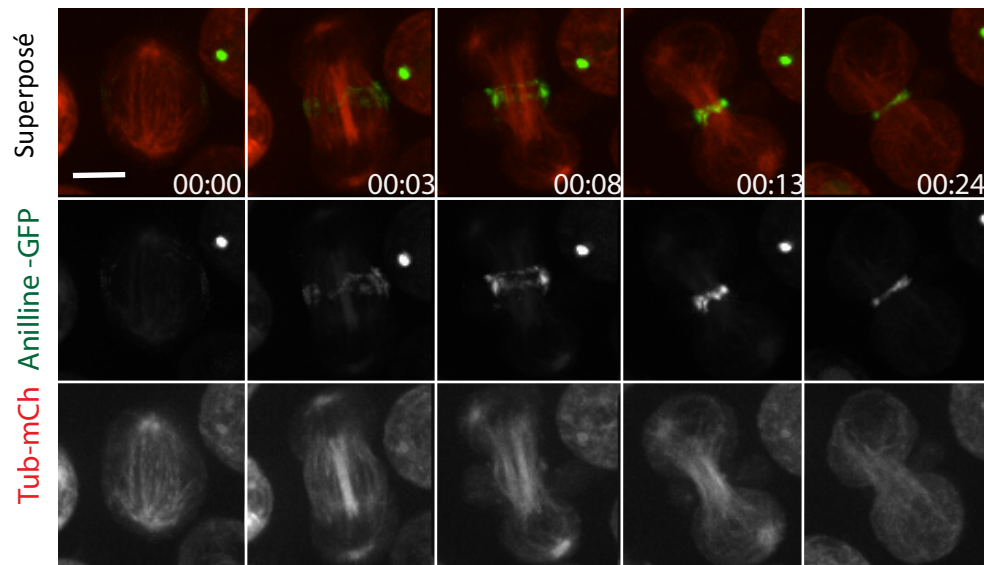


Figure 42: Les cellules traitées avec de la LatA et les cellules traitées avec de l'ARNdb contre Dia forment des structures similaires. Cellules exprimant Aniline GFP and Tub m-Ch suite à un traitement avec l'ARNdb contre LacI en contrôle suivi d'un traitement avec de la LatA (1 μ g/mL) en métaphase (A) ou suite au traitement avec de l'ARNdb contre Dia (Dia ARNi 1) d'une durée de 5 jours (B) Objectif 63X; échelle 5 μ m

Le traitement avec la LatA des cellules dépourvues de Dia montre que les *puncta* persistent et qu'elles s'étalent vers les pôles (Figure 43).

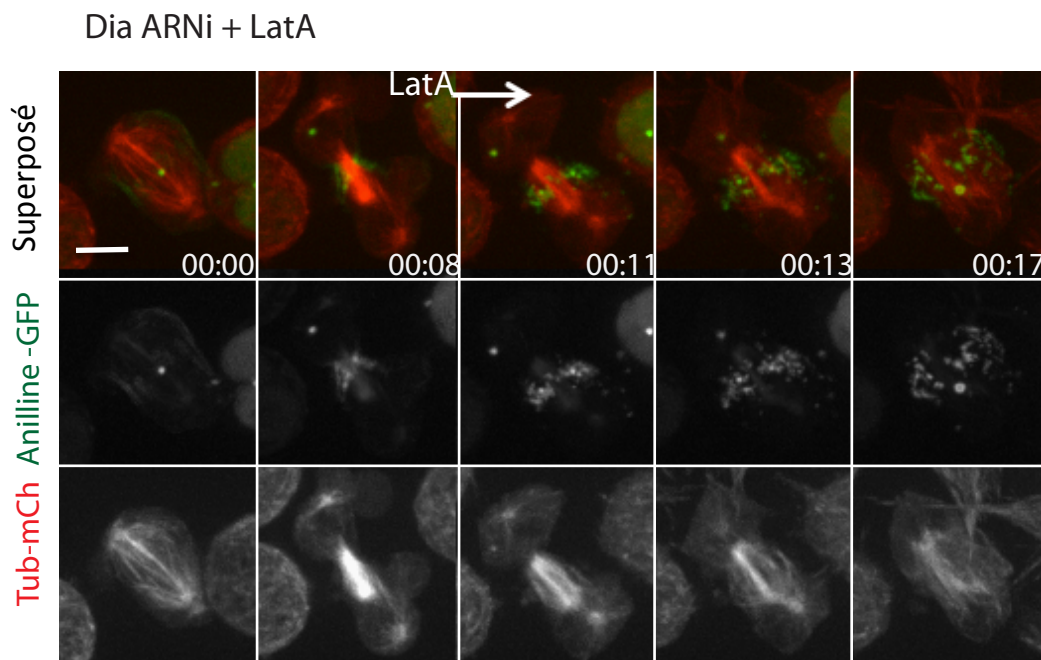


Figure 43: Les cellules traitées avec LatA et ARNdb contre Dia forment des structures plus écartées que Dia ARNdb. Cellules exprimant Aniline GFP and Tub m-Ch suite à un traitement de 5 jours avec ARNi contre Dia et un traitement avec LatA 8 minutes après le début d'anaphase. Objectif 63X; échelle 5µm

Donc, nous proposons un modèle où il y a deux populations d'actine : l'actine équatoriale et l'actine non équatoriale. Dia serait responsable de la nucléation de l'actine équatoriale pour permettre l'interaction dynamique des composants de l'AC. D'un autre côté, l'actine non équatoriale exercerait des forces vers l'équateur pour restreindre le volume occupé par l'AC (Figure 44).

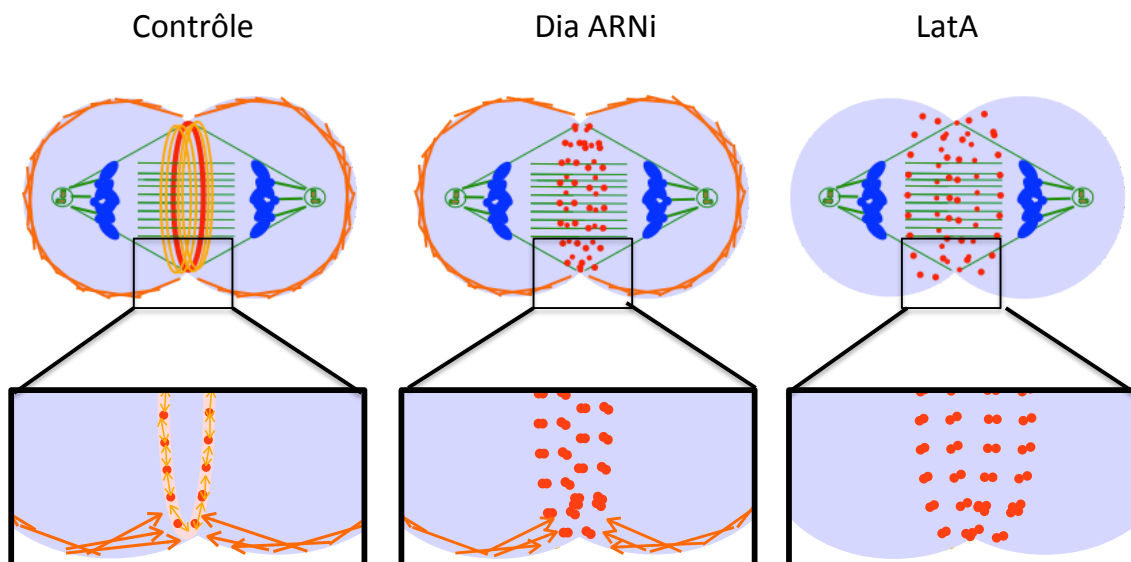


Figure 44: Deux populations d'actine sont nécessaires pour la formation appropriée de l'AC. Dans le contrôle, l'afflux d'actine non équatoriale (orange) maintient l'AC restreint à l'équateur pendant que l'actine équatoriale (jaune) est nucléée de novo et maintient l'AC dynamique. Lors de la déplétion de Dia, l'absence d'actine équatoriale empêche l'interaction adéquate des composantes de l'AC ce qui favorise le recrutement en *puncta*. L'afflux d'actine non équatoriale vers l'équateur est constant ce qui maintient les *puncta* localisées. La balance entre les deux populations d'actine est perdue suite au traitement à la Lat A ce qui favorise la formation des *puncta* mais ne permet pas de les tenir restreintes à l'équateur.

Pour déterminer quelle partie d'Anilline est responsable de la localisation des *punctas* en absence d'actine, nous avons étudié la distribution de deux troncations d'Anilline: le C terminal qui lie les septines et le N-terminal qui lie l'actine (Kechad, Jananji et al. 2012). L'Anilline N-terminal est capable de former un AM mais n'est pas capable de l'ancrer à la membrane, tandis que l'Anilline C-terminal n'est pas capable de former d'AM mais forme des *punctas* (El Amine, Kechad et al. 2013). La figure 45A montre qu'en situation contrôle, Anillind- Δ C et Anilline- Δ N sont toutes les deux recrutées à l'AC. Contrairement, lors du traitement avec ARNdb contre Dia, la partie

C-terminale de Anilline est recrutée à la zone équatoriale, mais la partie N-terminale n'est pas plus enrichie (Figure 45B et C).

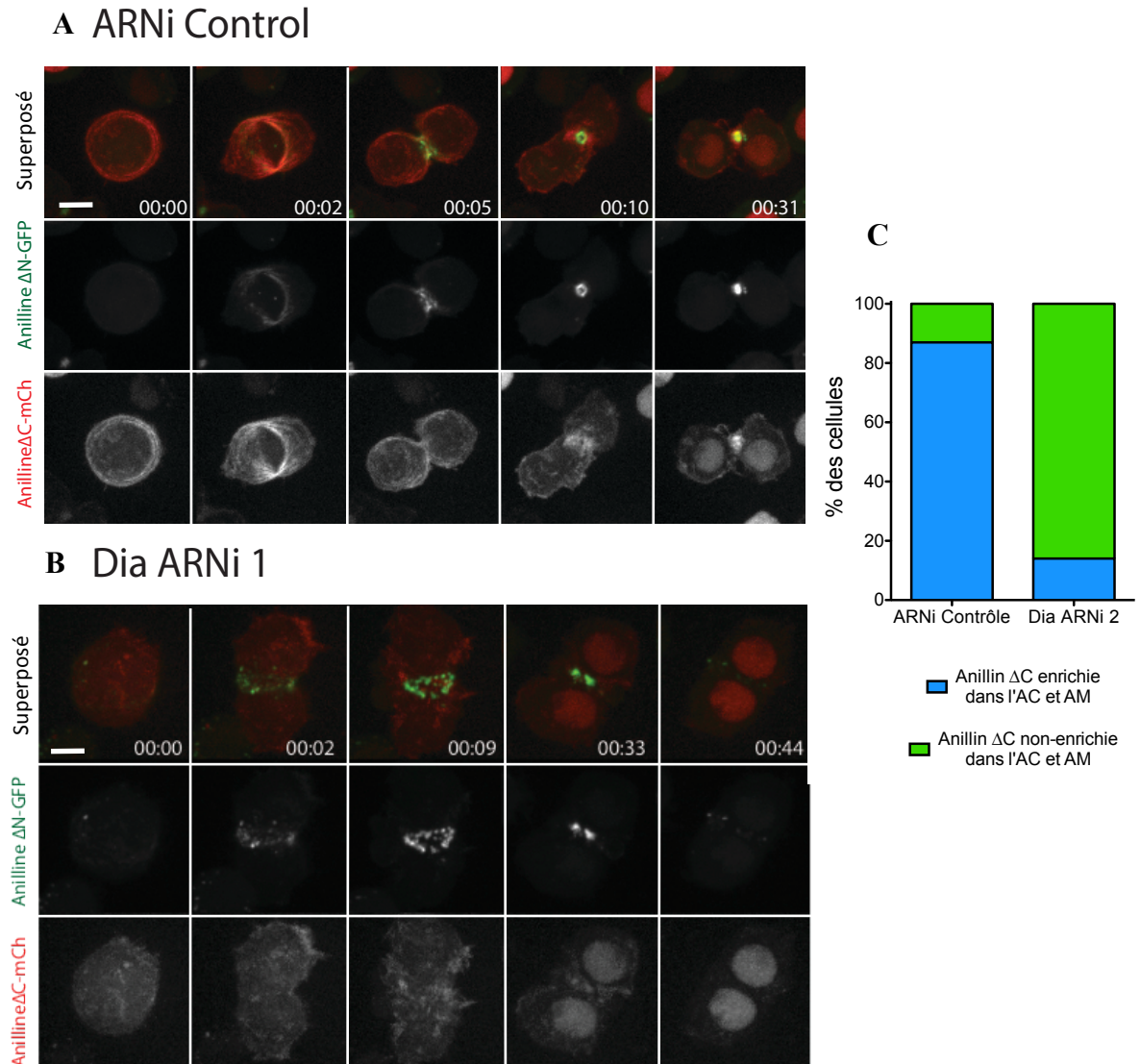


Figure 45: Seulement la partie C terminale d'Anilline est recrutée à l'équateur après déplétion de Dia. Cellules exprimant Anilline- Δ C mCh et Anilline- Δ N GFP après traitement pendant 6 jours avec ARNi contrôle (LacI) (A) ou Dia ARNi 1 (B). Quantification du pourcentage des cellules dont Anilline- Δ C était enrichie ou non dans l'AC. $n > 66$ (C)

La kinase citron est responsable de la maturation de l'AM et interagit avec la partie N-terminale d'Anilline. Nous avons testé l'effet d'une déplétion de la kinase citron (Sticky chez la drosophile) sur des cellules traitées aussi avec ARNdb contre Dia. Les cellules traitées avec ARNdb contre Citron kinase, forment un AC mais n'arrivent pas à maintenir l'AM qui se décompose juste avant que la cellule échoue la cytokinèse (Figure 46A). Comme déjà montré, les cellules avec ARNdb contre Dia forment des *puncta* d'Anilline dans L'AC (Figure 46B). La déplétion citron kinase dans des cellules en absence de Dia n'affecte pas la formation des *puncta* (Figure 46C).

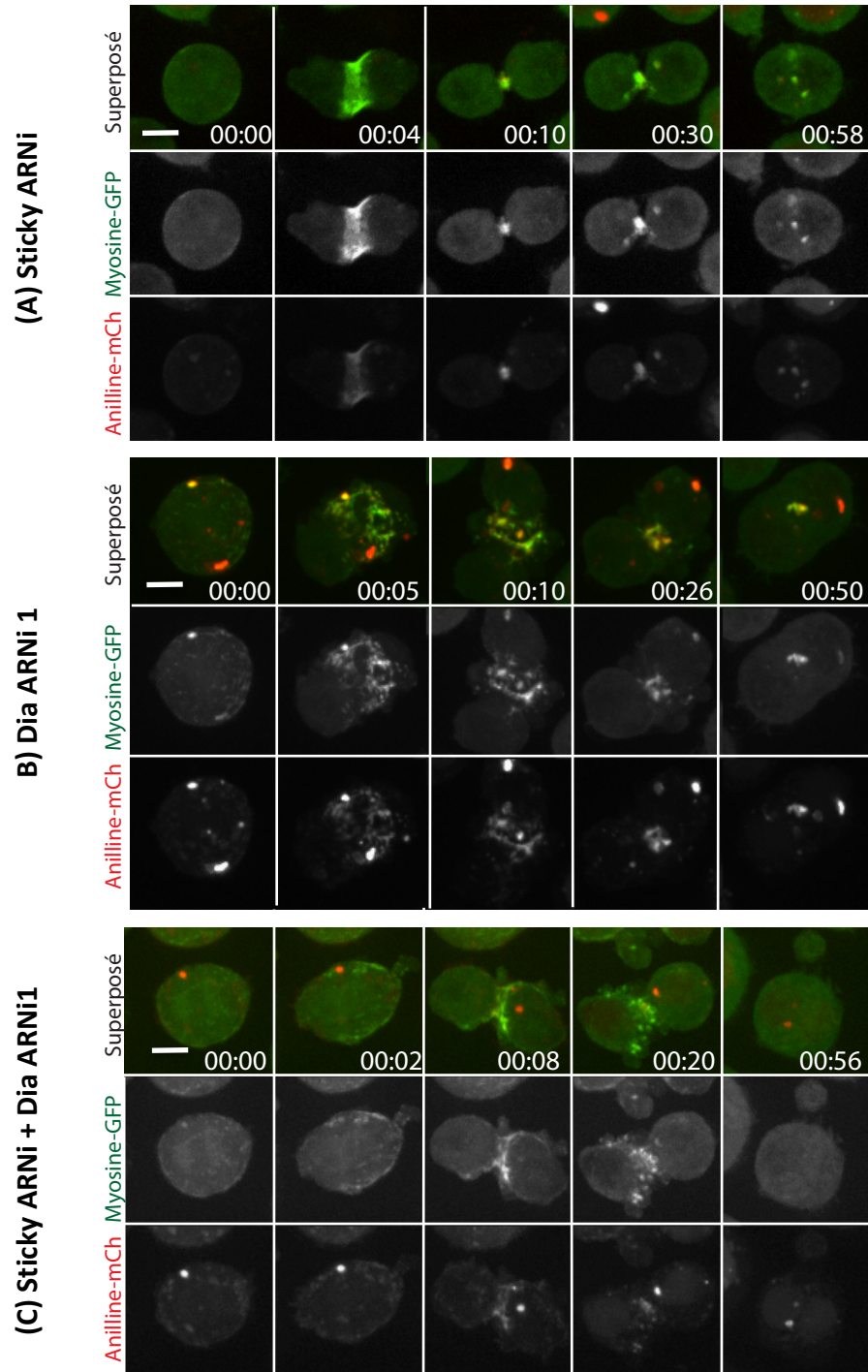


Figure 46: La déplétion de la kinase Citron n’affecte pas les *puncta* formés lors de la diminution de l’expression de Dia. Cellules exprimant Aniline m-Ch et MRLC sqh GFP en présence d’ARNi contre Sticky pendant 2 jours (A), ARNi contre Dia pendant 6 jours (B) et les deux ARNi combinés (C) Objectif 63X; échelle 5µm.

5 Discussion

La division cellulaire est un processus essentiel à la survie des organismes pluricellulaires. Des défauts dans la cytokinèse peuvent amener des problèmes majeurs et des maladies comme le cancer. Ceci explique l'importance d'étudier la division cellulaire et de décortiquer les éléments essentiels pour ce processus. Lors de cette étude nous nous sommes concentrés sur la formine Dia et le cytosquelette d'actine pendant la cytokinèse.

5.1 La déplétion de Dia par ARNdb est efficace

Pour commencer, nous avons mesuré jusqu'à quel point les niveaux d'expression de Dia diminuent dans des cellules de drosophile S2 suite au traitement par ARNdb. La Figure 19 montre qu'effectivement les niveaux de Dia diminuent après 72 h de traitement par différents ARNdb non superposées (Figure 18). Il faut remarquer que l'ARNdb est rajouté dans le milieu de culture et l'incorporation d'ARNi peut changer de cellule en cellule. De plus, nous faisons l'immunobuvardage avec des extraits totaux des cellules. Alors ce 75 % ne signifie pas que toutes les cellules ont subi une réduction des niveaux d'expression de Dia de 75 %. Sachant que Dia est essentielle pour la cytokinèse, la meilleure façon de déterminer si l'ARNi a été efficace serait de regarder la proportion des cellules binucléées dans l'échantillon. Alors, le fait d'avoir une réduction majeure de l'expression de Dia dans l'extrait total des cellules et de voir un phénotype d'échec dans la cytokinèse (Figure 20) nous garantit que la déplétion de Dia a été efficace.

5.2 La déplétion de Dia affecte la constriction équatoriale

Les mêmes phénotypes sont observés lors de la déplétion de Dia en utilisant deux ARNdb qui ciblent des régions différentes de l'ARNm (Figure 22). Le phénotype plus courant semble affecter la façon dont les microtubules sont comprimés dans le fuseau mitotique. Les cellules sont incapables de compléter l'étape de la constriction équatoriale et par conséquent n'arrivent pas à compléter la cytokinèse. L'autre

phénotype ne semble pas avoir des effets dans la constriction, mais les cellules échouent après la contraction. Ceci suggère que la perte de Dia pourrait affecter la formation de l'AC et c'est pour cela que les cellules n'arrivent pas à bien contracter ni à former un AM propre pour permettre l'abscission.

Le fait de voir deux phénotypes lors de la déplétion d'une seule protéine pourrait avoir deux explications possibles. La première option est que la perte de Dia pourrait mener à ces deux catégories du phénotype de façon stochastique. La deuxième est que les deux phénotypes pourraient refléter des niveaux différentes de déplétion de Dia. La déplétion par ARNdb n'est pas complète ni forcément égale d'une cellule à une autre. Donc, un phénotype pourrait être causé par une déplétion de Dia plus élevée que l'autre phénotype.

5.3 Dia est responsable de l'organisation de l'AC

Alors nous avons regardé le comportement des composants de l'AC. En absence de Dia, les composants de l'AC sont recrutés en *puncta* (Figures 24 et 27), la contraction est ralentie (Figure 25), les oscillations de l'AC augmentent (Figure 26) et une structure non-fonctionnelle se forme puisque les cellules échouent la cytokinèse (Figure 28). Un modèle qui pourrait expliquer cette distribution aberrante des composantes de l'AC est que la cellule aurait besoin de Dia pour nucléer les filaments d'actine qui vont tenir tout espacé. L'actine nucléée par Dia serait essentielle pour l'organisation appropriée des composants de l'AC, par exemple la fonction de l'Anilline à emballer des filaments d'actine pourrait empêcher la formation des *puncta*. La nucléation d'actine par Dia pourrait aussi tenir des molécules d'Anilline et Myosine physiquement séparées pour former un AC dynamique. Lorsque l'AM dévient indépendant d'actine les composantes sont plus proches ce qui stabilise l'AM. Alors, en enlevant l'agent nucléateur d'actine de l'AC, les molécules d'Anilline et Myosine se trouvent plus proches physiquement ce qui les stabilise en *puncta*.

5.4 Dia localise à l'AC et à l'AM prématuré

Avant d'utiliser la construction de Dia-mCh, sa fonctionnalité a été testée en diminuant les niveaux d'expression de la Dia endogène. Dia-mCh est capable de restaurer la cytokinèse lors de la diminution des niveaux endogènes de la protéine (Figure 29). Il y a des cellules qui réussissent la cytokinèse même après traitement avec ARNdb 5' ou 3' UTR sans induction. Possiblement, il y a un niveau minimal d'expression de Dia-mCh et, sachant que la cellule n'a pas besoin des quantités énormes de Dia, cette expression minimale pourrait être suffisante pour restaurer le manque de Dia endogène. Une fois vérifiée la fonctionnalité de la construction Dia-mCh, nous avons observé la localisation de Dia pendant la cytokinèse. Dia localise bien à l'AC et à l'AM. Cependant, l'expression de Dia diminue dans l'AM pendant les 30 premières minutes (Figure 30), ce qui concorde avec le modèle où la présence de Dia permettrait de maintenir l'AC dynamique jusqu'à ce qu'il se stabilise en AM. Il faut mentionner que l'expression de Dia n'est pas très forte, nous soupçonnons que c'est en partie parce il n'y a pas beaucoup des molécules de Dia dans l'AC. Selon une étude faite dans la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*, il y a seulement deux molécules de Dia par chaque unité de l'AC qui comporte jusqu'à 21 molécules d'Anilline et 43 molécules de Myosine (Wu and Pollard 2005). Ceci pourrait expliquer le signal très faible de Dia dans l'AC. Néanmoins, nous pouvons constater la sortie de Dia de l'AM dans plusieurs lignées cellulaires (Figure 31). Alors, Dia est présente à l'AC pour favoriser le dynamisme et quitte l'AM en même temps où il devient indépendant d'actine et plus stable.

5.5 L'actine n'est pas nécessaire pour la sortie de Dia de l'AM et pour son recrutement à l'AC

Une fois recrutée, Dia reste à la région équatoriale même après la dépolymérisation des filaments d'actine par LatA (Figure 32). Les niveaux de Dia diminuent aussi dans cette condition tandis que les niveaux de Anilline restent élevés.

Ceci suggère que la régulation temporelle de la sortie de Dia de l'AM ne dépend pas ni de l'actine ni du niveau de constriction de l'AM. Étant une protéine qui lie l'actine, nous voulions déterminer si son recrutement était dépendant de l'actine. Dans la figure 33 nous observons que Dia est recrutée même en absence de F-actine. Toutefois, l'actine pourrait être responsable en partie du recrutement de Dia, mais elle n'est pas essentielle.

5.6 Le RBD et le domaine FH1FH2 ne sont pas responsables du recrutement de Dia

Pour ce qui est des troncations de Dia (Figure 35A), aucune des constructions est recrutée à l'AC. Le fait que la région qui est supposée de lier Rho ne soit pas recrutée suggère que même si c'est là que l'interaction se fait, Dia a besoin d'une autre portion de la protéine pour se rendre à l'AC. Comme dans mDia2 (Watanabe, Okawa et al. 2010), une partie du DID pourrait interagir avec l'Anilline pour se localiser à l'AC. De même façon, le domaine FH1FH2 n'est pas suffisant pour expliquer la localisation de Dia (Figure 35B). Dia interagit avec plusieurs autres protéines de l'AC, alors ça pourrait être par l'intermédiaire de ces autres protéines que Dia arrive à l'AC et par la suite est activée par son interaction avec Rho. Plus d'études des différentes troncations de Dia seraient utiles afin caractériser le recrutement de Dia à l'AC chez la drosophile.

5.7 Dia est responsable de l'enrichissement d'actine dans l'AC

L'actine est enrichie dans l'AC (Figure 36), les niveaux augmentent au début de la formation de l'AM (Figure 37 et Annexe A) et par la suite diminuent considérablement. L'actine diminue à l'AM au même temps qu'elle devient dispensable pour compléter la cytokinèse. Sachant que la cellule n'a plus besoin

d'actine et que Dia en plus de nucléer de l'actine quitte aussi en moyenne 30 minutes après l'organisation de l'AM, nous pouvons proposer que Dia produit les filaments d'actine indispensables pour la formation de l'AC et une fois que la cellule n'en a plus besoin, elle quitte de l'AM.

Pour tester cette hypothèse, nous avons diminué l'expression de Dia dans des cellules qui expriment LifeAct pour ainsi voir l'effet sur l'Actine. Il y a une claire diminution d'actine spécifique à la région équatoriale (Figures 38, 39 et 41). Les niveaux d'Anilline à l'équateur diminuent aussi en absence de Dia, mais cette différence n'est pas significative. Rappelons les deux modèles qui expliquent l'augmentation d'actine dans l'AC. Un modèle suggère que l'actine afflue des pôles vers l'équateur tandis que l'autre propose qu'il y ait nucléation *de novo* dans l'AC. Ensemble, ces résultats soutiennent le modèle de nucléation *de novo*. En éliminant un nucléateur d'actine, on réduit significativement la quantité d'actine à l'équateur. Le fait d'enlever un nucléateur qui localise principalement à l'AC pendant la cytokinèse, ne devrait pas affecter l'afflue d'actine vers l'équateur.

Ces observations concordent avec le modèle où Dia serait responsable de la nucléation d'actine précise à l'AC pour maintenir la structure dynamique. Dia serait présente à l'AM jusqu'au moment où l'AM n'a plus besoin d'actine et les composants sont stabilisés. Alors la perte régulée de Dia serait importante pour permettre la transition de l'étape dépendante d'actine (sensible au LatA) à l'étape indépendante d'actine (pas sensible à LatA) pendant la cytokinèse (Figure 41).

Il serait idéale de pouvoir détecter par immunobuvardage une diminution des quantités totales d'actine lors de la déplétion de Dia. Néanmoins, nous n'attendons pas que les niveaux d'actine totaux soient changés, car il existe un mécanisme de rétrocontrôle au niveau de la transcription des gènes d'actines, qui ferait en sorte qu'une diminution d'actine filamenteuse résulte en une augmentation de production d'actine monomérique, équilibrant ainsi les quantités totales d'actine.

5.8 Deux populations d'actine sont responsables de la formation et encadrement de l'AC

Le traitement des cellules avec LatA forme des structures d'Anilline à l'équateur (Hickson and O'Farrell 2008) (Figure 43A) qui ressemblent à celles observées lors du traitement avec de l'ARNdb contre Dia (Figure 42B). Néanmoins, elles sont plus dispersées et occupent une zone plus grande que celles observées lors de la déplétion de Dia. Par ailleurs, les *puncta* formées suite à la déplétion de Dia se sont aussi étalés dans une zone plus large après le traitement à la LatA (Figure 43).

Lors de la diminution de Dia, on diminue aussi les filaments d'actine dans l'équateur (Figure 41). Alors, une différence entre les cellules traitées avec Dia ARNdb et Dia ARNdb plus LatA c'est l'actine non équatoriale. L'étalement des *puncta*, suggère que l'actine non équatoriale pourrait avoir un effet ou un rôle dans la composition de l'AC. Une hypothèse qui pourrait réconcilier le modèle de l'afflux d'actine et le modèle de la nucléation *de novo* à l'AC pourrait être la suivante : Dia pourrait être responsable de la polymérisation d'actine pour son accumulation dans l'AC et pour le maintenir dynamique, mais l'actine non équatoriale pourrait être essentielle pour tenir les composants de l'AC contraints à l'équateur via un afflux des pôles vers l'équateur (Figure 44).

5.9 L'Anilline est recrutée par son domaine C-terminal aux *puncta* issues d'une perte de l'actine équatoriale

Par la suite, nous avons testé quelle partie de l'Anilline est responsable du recrutement de la protéine aux *puncta*. L'Anilline-ΔC est responsable de lier le cortex d'actine tandis que l'Anilline-ΔN sert d'ancrage de la membrane à l'AC (Kechad, Jananji et al. 2012). Une diminution considérable du recrutement de la partie N-terminale d'Anilline lors de la diminution de l'expression de Dia (Figure 45) indique que son recrutement est normalement dépendante de Dia et/ou de l'actine nucléée par

Dia. Une interaction directe entre Anilline et Dia a été reportée seulement pour mDia2. Si Dia chez la drosophile interagit avec Anilline par son extrémité N terminale, comme est le cas de mDia2, cette interaction directe pourrait expliquer l'absence d'enrichissement de Anilline N-terminale. Néanmoins, le côté N-terminal d'Anilline contient le domaine de liaison à l'actine (ABD, « Actin Binding Domain ») ce qui pourrait suggérer que la diminution d'actine supprime le recrutement de l'Anilline- Δ C. En plus, en présence de LatA Dia est toujours recrutée mais Anilline N-terminal n'est pas recruté (données non publiées du laboratoire). Donc l'actine nucléée par Dia semblerait être nécessaire pour le recrutement de l'Anilline- Δ C. Finalement, nous avons regardé l'effet de la déplétion de la kinase citron sur les *puncta* issues de la diminution d'expression de Dia (Figure 46). La kinase citron interagit aussi avec cortex dans l'AM. La déplétion de la kinase citron n'affecte pas le recrutement des composants de l'AC en *puncta* lors de la déplétion de Dia. Ceci confirme que les *puncta* que nous observons en absence de Dia sont recrutés par le domaine C-terminal d'Anilline.

5.10 Perspectives et futures expériences

Même si le rôle principal de Dia est la nucléation d'actine, il se pourrait que Dia ait d'autres rôles dans l'AC. C'est pourquoi nous avons généré un mutant de Dia incapable de lier l'actine (Annexe B). La génération des lignées cellulaires contenant ce mutant nous aidera à déterminer si Dia a un rôle autre que la nucléation de l'actine.

Dans un autre ordre d'idées, nous proposons de créer un mutant de Dia incapable de quitter l'AM afin de tester la fonction du contrôle temporel de Dia dans l'AM. Ceci serait possible en couplant Dia à une protéine qui reste plus longtemps à l'AM. Il faudrait tenir en compte que cette expérience pourrait changer l'équilibre structurel au niveau de l'AC.

Comme il a déjà été mentionné, l'interaction entre Dia et l'Anilline chez la drosophile n'a pas encore été caractérisée. Des immunoprécipitations des différentes fractions de Dia et Anilline pourraient aider à éclaircir cette interaction. Donc, beaucoup d'études restent à être faites pour élucider le rôle de Dia dans la cytokinèse.

6 Conclusion

Cette étude contribue à la compréhension du rôle de la formine Dia dans la cytokinèse. La nucléation d'actine par Dia semble être essentielle pour l'organisation dynamique de l'AC. En effet, la déplétion de Dia montre une diminution de l'actine équatoriale et un recrutement aberrant des composants de l'AC. En outre, Dia quitte l'AM lorsque il devient une structure stable et indépendante de l'actine. Nous avons montré que le recrutement et le contrôle temporel de Dia n'est pas dépendant de l'actine.

Nous avons montré que les composants de l'AC sont recrutées en forme de *puncta* lors de la déplétion de Dia. Aussi, Les cellules contractent plus lentement et oscillent plus ce qui mène à un échec de la cytokinèse. Les *puncta* sont aussi présents lors de la dépolymérisation de l'actine par LatA et la partie N terminale de l'Anilline n'est pas recrutée à ces structures. L'actine, Dia et la partie N terminale d'Anilline sont chacun essentiel pour prévenir la formation de ces *puncta* et donc maintenir l'AC dynamique.

Finalement, nous proposons un modèle où deux populations d'actine seraient présentes dans la cellule en division. L'actine équatoriale qui maintient l'AC dynamique et l'actine non équatoriale affluent vers l'équateur pour tenir l'AC restreint à l'équateur. Dia serait responsable de la nucléation de l'actine équatoriale et la perte contrôlée de Dia au niveau de l'AM serait essentielle pour permettre la maturation de l'AM.

7 Bibliographie

- Adams, R. R., A. A. Tavares, et al. (1998). "pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis." Genes Dev **12**(10): 1483-1494.
- Afshar, K., B. Stuart, et al. (2000). "Functional analysis of the *Drosophila* diaphanous FH protein in early embryonic development." Development **127**(9): 1887-1897.
- Allingham, J. S., V. A. Klenchin, et al. (2006). "Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action." Cell Mol Life Sci **63**(18): 2119-2134.
- Bakhoun, S. F., S. L. Thompson, et al. (2009). "Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics." Nat Cell Biol **11**(1): 27-35.
- Bartolini, F., J. B. Moseley, et al. (2008). "The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity." J Cell Biol **181**(3): 523-536.
- Bassi, Z. I., K. J. Verbrugghe, et al. (2011). "Sticky/Citron kinase maintains proper RhoA localization at the cleavage site during cytokinesis." J Cell Biol **195**(4): 595-603.
- Bement, W. M., H. A. Benink, et al. (2005). "A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification." J Cell Biol **170**(1): 91-101.
- Bement, W. M., A. L. Miller, et al. (2006). "Rho GTPase activity zones and transient contractile arrays." Bioessays **28**(10): 983-993.
- Blanchoin, L., K. J. Amann, et al. (2000). "Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins." Nature **404**(6781): 1007-1011.
- Bluemink, J. G. and S. W. de Laat (1973). "New membrane formation during cytokinesis in normal and cytochalasin B-treated eggs of *Xenopus laevis*. I. Electron microscope observations." J Cell Biol **59**(1): 89-108.
- Bueno, A. and P. Russell (1992). "Dual functions of CDC6: a yeast protein required for DNA replication also inhibits nuclear division." EMBO J **11**(6): 2167-2176.
- Burton, K. and D. L. Taylor (1997). "Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata." Nature **385**(6615): 450-454.
- Busson, S., D. Dujardin, et al. (1998). "Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells." Curr Biol **8**(9): 541-544.
- Cao, L. G. and Y. L. Wang (1990). "Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. II. Cortical movement of microinjected actin filaments." J Cell Biol **111**(5 Pt 1): 1905-1911.
- Carrier, M. F. (1998). "Control of actin dynamics." Curr Opin Cell Biol **10**(1): 45-51.

- Carpenter, P. B., P. R. Mueller, et al. (1996). "Role for a *Xenopus* Orc2-related protein in controlling DNA replication." *Nature* **379**(6563): 357-360.
- Castrillon, D. H., P. Gonczy, et al. (1993). "Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis." *Genetics* **135**(2): 489-505.
- Castrillon, D. H. and S. A. Wasserman (1994). "Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene." *Development* **120**(12): 3367-3377.
- Chesarone, M. A., A. G. DuPage, et al. (2010). "Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(1): 62-74.
- DeBiasio, R. L., G. M. LaRocca, et al. (1996). "Myosin II transport, organization, and phosphorylation: evidence for cortical flow/solution-contraction coupling during cytokinesis and cell locomotion." *Mol Biol Cell* **7**(8): 1259-1282.
- Devore, J. J., G. W. Conrad, et al. (1989). "A model for astral stimulation of cytokinesis in animal cells." *J Cell Biol* **109**(5): 2225-2232.
- DeWard, A. D., K. M. Eisenmann, et al. (2010). "The role of formins in human disease." *Biochim Biophys Acta* **1803**(2): 226-233.
- Dobbelaere, J., M. S. Gentry, et al. (2003). "Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle." *Dev Cell* **4**(3): 345-357.
- Dylewski, D. P. and T. W. Keenan (1984). "Centrioles in the mammary epithelium of the rat." *J Cell Sci* **72**: 185-193.
- Eisenmann, K. M., R. A. West, et al. (2007). "T cell responses in mammalian diaphanous-related formin mDial1 knock-out mice." *J Biol Chem* **282**(34): 25152-25158.
- El Amine, N., A. Kechad, et al. (2013). "Opposing actions of septins and Sticky on Anillin promote the transition from contractile to midbody ring." *J Cell Biol* **203**(3): 487-504.
- Field, C. M. and B. M. Alberts (1995). "Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex." *J Cell Biol* **131**(1): 165-178.
- Field, C. M., M. Coughlin, et al. (2005). "Characterization of anillin mutants reveals essential roles in septin localization and plasma membrane integrity." *Development* **132**(12): 2849-2860.
- Fujiwara, T., M. Bandi, et al. (2005). "Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells." *Nature* **437**(7061): 1043-1047.
- Glotzer, M. (2005). "The molecular requirements for cytokinesis." *Science* **307**(5716): 1735-1739.
- Gonen, S., B. Akiyoshi, et al. (2012). "The structure of purified kinetochores reveals multiple microtubule-attachment sites." *Nat Struct Mol Biol* **19**(9): 925-929.

- Goode, B. L. and M. J. Eck (2007). "Mechanism and function of formins in the control of actin assembly." Annu Rev Biochem **76**: 593-627.
- Green, R. A., E. Paluch, et al. (2012). "Cytokinesis in animal cells." Annu Rev Cell Dev Biol **28**: 29-58.
- Gromley, A., C. Yeaman, et al. (2005). "Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission." Cell **123**(1): 75-87.
- Guizetti, J., L. Schermelleh, et al. (2011). "Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments." Science **331**(6024): 1616-1620.
- Hickson, G. R. and P. H. O'Farrell (2008). "Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis." J Cell Biol **180**(2): 285-294.
- Higgs, H. N. and K. J. Peterson (2005). "Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain." Mol Biol Cell **16**(1): 1-13.
- Hirano, T., R. Kobayashi, et al. (1997). "Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein." Cell **89**(4): 511-521.
- Holmes, K. C., D. Popp, et al. (1990). "Atomic model of the actin filament." Nature **347**(6288): 44-49.
- Huberman, J. A. and A. Tsai (1973). "Direction of DNA replication in mammalian cells." J Mol Biol **75**(1): 5-12.
- Huret, J. L., M. Ahmad, et al. (2013). "Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D920-924.
- Inoue, S. and E. D. Salmon (1995). "Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements." Mol Biol Cell **6**(12): 1619-1640.
- Ishizaki, T., Y. Morishima, et al. (2001). "Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1." Nat Cell Biol **3**(1): 8-14.
- Jaiswal, R., V. Stepanik, et al. (2013). "Drosophila homologues of adenomatous polyposis coli (APC) and the formin diaphanous collaborate by a conserved mechanism to stimulate actin filament assembly." J Biol Chem **288**(19): 13897-13905.
- Jantsch-Plunger, V., P. Gonczy, et al. (2000). "CYK-4: A Rho family gtpase activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis." J Cell Biol **149**(7): 1391-1404.
- Jaqaman, K., E. M. King, et al. (2010). "Kinetochore alignment within the metaphase plate is regulated by centromere stiffness and microtubule depolymerases." J Cell Biol **188**(5): 665-679.

- Joo, E., M. C. Surka, et al. (2007). "Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases." Dev Cell **13**(5): 677-690.
- Kabeche, L. and D. A. Compton (2013). "Cyclin A regulates kinetochore microtubules to promote faithful chromosome segregation." Nature **502**(7469): 110-113.
- Kabsch, W., H. G. Mannherz, et al. (1990). "Atomic structure of the actin:DNase I complex." Nature **347**(6288): 37-44.
- Kechad, A., S. Jananji, et al. (2012). "Anillin acts as a bifunctional linker coordinating midbody ring biogenesis during cytokinesis." Curr Biol **22**(3): 197-203.
- Kimura, K., T. Tsuji, et al. (2000). "Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis and a critical role of ECT2 in this accumulation." J Biol Chem **275**(23): 17233-17236.
- Kinoshita, M., C. M. Field, et al. (2002). "Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins." Dev Cell **3**(6): 791-802.
- Kinoshita, M., S. Kumar, et al. (1997). "Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures." Genes Dev **11**(12): 1535-1547.
- Kishi, K., T. Sasaki, et al. (1993). "Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI)." J Cell Biol **120**(5): 1187-1195.
- Kovar, D. R., E. S. Harris, et al. (2006). "Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin." Cell **124**(2): 423-435.
- Lancaster, O. M., M. Le Berre, et al. (2013). "Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation." Dev Cell **25**(3): 270-283.
- Lecuit, T. and E. Wieschaus (2000). "Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo." J Cell Biol **150**(4): 849-860.
- Loeb, L. A. (1969). "Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase from nuclei of sea urchin embryos." J Biol Chem **244**(7): 1672-1681.
- Madaule, P., M. Eda, et al. (1998). "Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis." Nature **394**(6692): 491-494.
- Marston, A. L. and A. Amon (2004). "Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(12): 983-997.
- Mastronarde, D. N., K. L. McDonald, et al. (1993). "Interpolar spindle microtubules in PTK cells." J Cell Biol **123**(6 Pt 1): 1475-1489.
- Mazia, D., P. J. Harris, et al. (1960). "The Multiplicity of the Mitotic Centers and the Time-Course of Their Duplication and Separation." J Biophys Biochem Cytol **7**(1): 1-20.

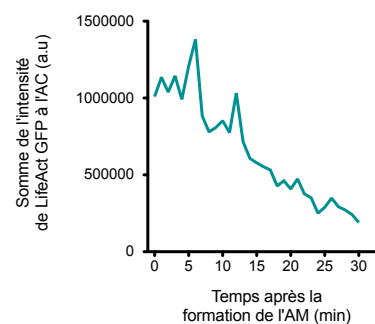
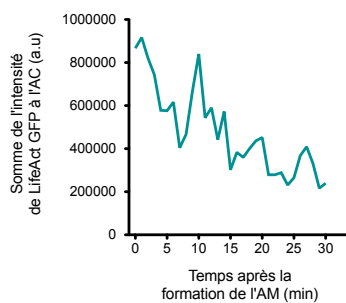
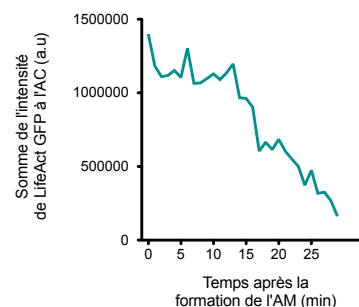
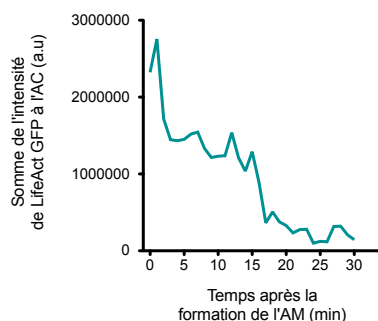
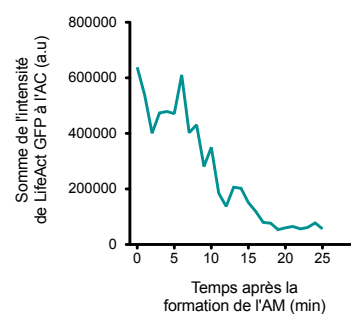
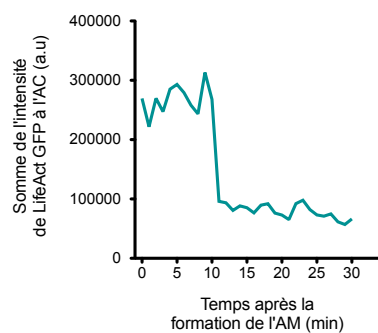
- Mishima, M., S. Kaitna, et al. (2002). "Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity." Dev Cell **2**(1): 41-54.
- Morgan, D. O. (2007). The cell cycle. Principles of control. . Sunderland, MA, New Science Press Ltd.
- Mullins, J. M. and J. J. Biesele (1977). "Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells." J Cell Biol **73**(3): 672-684.
- Naim, V., S. Imarisio, et al. (2004). "Drosophila citron kinase is required for the final steps of cytokinesis." Mol Biol Cell **15**(11): 5053-5063.
- Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila." Nature **287**(5785): 795-801.
- O'Connell, C. B., S. P. Wheatley, et al. (1999). "The small GTP-binding protein rho regulates cortical activities in cultured cells during division." J Cell Biol **144**(2): 305-313.
- O'Connor, C. M. a. A., J. U. (2010). The Eukaryotic Cell Cycle Consists of Discrete Phases. Essentials of Cell Biology Cambridge, MA, NPG Education.
- Oda, T. (2010). "Revealing the mechanism behind the constant motion of organisms from the structure of filamentous actin." Retrieved December 2013, 2013.
- Oliferenko, S., T. G. Chew, et al. (2009). "Positioning cytokinesis." Genes Dev **23**(6): 660-674.
- Ostrow, B. D., P. Chen, et al. (1994). "Expression of a myosin regulatory light chain phosphorylation site mutant complements the cytokinesis and developmental defects of Dictyostelium RMLC null cells." J Cell Biol **127**(6 Pt 2): 1945-1955.
- Pelham, R. J. and F. Chang (2002). "Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast." Nature **419**(6902): 82-86.
- Piekny, A. J. and M. Glotzer (2008). "Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis." Curr Biol **18**(1): 30-36.
- Piekny, A. J. and A. S. Maddox (2010). "The myriad roles of Anillin during cytokinesis." Semin Cell Dev Biol **21**(9): 881-891.
- Pollard, T. D. (1986). "Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments." J Cell Biol **103**(6 Pt 2): 2747-2754.
- Prokopenko, S. N., A. Brumby, et al. (1999). "A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in Drosophila." Genes Dev **13**(17): 2301-2314.
- Pruyne, D., M. Evangelista, et al. (2002). "Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association." Science **297**(5581): 612-615.
- Quinlan, M. E., J. E. Heuser, et al. (2005). "Drosophila Spire is an actin nucleation factor." Nature **433**(7024): 382-388.

- Rappaport, R. (1961). "Experiments concerning the cleavage stimulus in sand dollar eggs." J Exp Zool **148**: 81-89.
- Rialland, M., F. Sola, et al. (2002). "Essential role of human CDT1 in DNA replication and chromatin licensing." J Cell Sci **115**(Pt 7): 1435-1440.
- Riedl, J., A. H. Crevenna, et al. (2008). "Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin." Nat Methods **5**(7): 605-607.
- Rotty, J. D., C. Wu, et al. (2013). "New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(1): 7-12.
- Sanger, J. W. (1975). "Changing patterns of actin localization during cell division." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(5): 1913-1916.
- Schneider, I. (1972). "Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*." J Embryol Exp Morphol **27**(2): 353-365.
- Schroeder, T. E. (1973). "Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(6): 1688-1692.
- Sept, D. and J. A. McCammon (2001). "Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation." Biophys J **81**(2): 667-674.
- Severson, A. F., D. L. Baillie, et al. (2002). "A Formin Homology protein and a profilin are required for cytokinesis and Arp2/3-independent assembly of cortical microfilaments in *C. elegans*." Curr Biol **12**(24): 2066-2075.
- Stafstrom, J. P. and L. A. Staehelin (1984). "Dynamics of the nuclear envelope and of nuclear pore complexes during mitosis in the *Drosophila* embryo." Eur J Cell Biol **34**(1): 179-189.
- Steigemann, P. and D. W. Gerlich (2009). "Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody." Trends Cell Biol **19**(11): 606-616.
- Tatsumoto, T., X. Xie, et al. (1999). "Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis." J Cell Biol **147**(5): 921-928.
- Uhlmann, F., F. Lottspeich, et al. (1999). "Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1." Nature **400**(6739): 37-42.
- Wang, Y. L., J. D. Silverman, et al. (1994). "Single particle tracking of surface receptor movement during cell division." J Cell Biol **127**(4): 963-971.
- Watanabe, N., P. Madaule, et al. (1997). "p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin." EMBO J **16**(11): 3044-3056.
- Watanabe, S., Y. Ando, et al. (2008). "mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells." Mol Biol Cell **19**(5): 2328-2338.

- Watanabe, S., T. De Zan, et al. (2013). "Citron kinase mediates transition from constriction to abscission through its coiled-coil domain." J Cell Sci **126**(Pt 8): 1773-1784.
- Watanabe, S., K. Okawa, et al. (2010). "Rho and anillin-dependent control of mDia2 localization and function in cytokinesis." Mol Biol Cell **21**(18): 3193-3204.
- Wegner, A. (1976). "Head to tail polymerization of actin." J Mol Biol **108**(1): 139-150.
- Weirich, C. S., J. P. Erzberger, et al. (2008). "The septin family of GTPases: architecture and dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(6): 478-489.
- Wen, Y., C. H. Eng, et al. (2004). "EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration." Nat Cell Biol **6**(9): 820-830.
- White, J. G. and G. H. Rao (1983). "Influence of a microtubule stabilizing agent on platelet structural physiology." Am J Pathol **112**(2): 207-217.
- Winder, S. J. and K. R. Ayscough (2005). "Actin-binding proteins." J Cell Sci **118**(Pt 4): 651-654.
- Wu, J. Q. and T. D. Pollard (2005). "Counting cytokinesis proteins globally and locally in fission yeast." Science **310**(5746): 310-314.
- Yamashiro, S., G. Totsukawa, et al. (2003). "Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II." Mol Biol Cell **14**(5): 1745-1756.
- Yasuda, S., F. Ocegüera-Yanez, et al. (2004). "Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores." Nature **428**(6984): 767-771.
- Young, K. G. and J. W. Copeland (2010). "Formins in cell signaling." Biochim Biophys Acta **1803**(2): 183-190.
- Yuce, O., A. Piekny, et al. (2005). "An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA." J Cell Biol **170**(4): 571-582.
- Zang, J. H. and J. A. Spudich (1998). "Myosin II localization during cytokinesis occurs by a mechanism that does not require its motor domain." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13652-13657.
- Zanin, E., A. Desai, et al. (2013). "A conserved RhoGAP limits M phase contractility and coordinates with microtubule asters to confine RhoA during cytokinesis." Dev Cell **26**(5): 496-510.
- Zavortink, M., N. Contreras, et al. (2005). "Tum/RacGAP50C provides a critical link between anaphase microtubules and the assembly of the contractile ring in *Drosophila melanogaster*." J Cell Sci **118**(Pt 22): 5381-5392.

Annexe A

Nous avons suivi le comportement de l'actine pendant la cytokinèse. Les figures 36 et 37 montrent une augmentation soudaine de l'actine suite à la formation de l'AM. Cet enrichissement arrive à différents moments après la formation de l'AM pour chaque cellule. Ici nous présentons des exemples des cellules, toutes avec une augmentation soudaine qui n'est pas reliée entre elles dans le temps.



Annexe B

Une mutation a été insérée à la troncature DiaFH1FH2 afin de avoir un mutant de Dia incapable de lier des filaments d'actine comme dans (Ishizaki, Morishima et al. 2001). Trois mutations ponctuelles par PCR ont été faites comme suit : K837A, K842A, K847A en utilisant les amorces suivantes :

Table V: Séquences des amorces utilisées pour faire le mutant de Dia K837,842,847A

Dia_K837A_F	ATCAGTTATTTAACCGCACTGTCCAATACGAAG
Dia_K837_R	CTTCGTATTGGACAGTGCGGTTAAATAACTGAT
Dia_K842_F	GCACTGTCCAATACGGCGGATGCGGATAATAAG
Dia_K842_R	CTTATTATCCGCATCCGCCGTATTGGACAGTGC
Dia_K847_F	GCGGATGCGGATAATGCGCAGACATTGCTGCAC
Dia_K847_R	GTGCAGCAATGTCTGCGCATTATCCGCATCCGC

Une première PCR a été faite avec les amorces pour la mutation K837A, cette PCR a été utilisé comme template pour la deuxième PCR avec les amorces pour la mutation K842A et une dernière PCR a été réalisée pour le K847A. Une fois séquencée cette mutation, une digestion avec EcoRI et AatII a été réalisée a fin de introduire la séquence mutante dans Dia. La mutation a été vérifiée par séquençage, mais malheureusement les niveaux d'expression de ce mutant n'étaient pas assez élevés pour l'analyser.